

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

DESENVOLVIMENTO DE NANOEMULSÕES PARA ADMINISTRAÇÃO INTRAVENOSA  
DA TALIDOMIDA

Fabricio Aguiar de Araújo

Porto Alegre, 2010



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

DESENVOLVIMENTO DE NANOEMULSÕES PARA ADMINISTRAÇÃO INTRAVENOSA  
DA TALIDOMIDA

Dissertação apresentada por **Fabício Aguiar de Araújo** para obtenção do GRAU DE MESTRE em Ciências Farmacêuticas

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Leticia Scherer Koester

Porto Alegre, 2010

Tese/Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, em nível de Mestrado – Produção e Controle de Qualidade de Produtos Farmacêuticos - da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul e aprovada em 29.03.2010, pela Banca Examinadora constituída por:

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Angela Machado de Campos  
Universidade Federal de Santa Catarina

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Silvia Stanisçuaski Guterres  
Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Valquiria Linck Bassani  
Universidade Federal do Rio Grande do Sul

A663d Araújo, Fabrício Aguiar de  
Desenvolvimento de nanoemulsões para administração intravenosa da talidomida / Fabrício Aguiar de Araújo. – Porto Alegre: UFRGS, 2010. – xvi, 122 p.: il.

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

1. Nanoemulsões. 2. Talidomida. 3. Validação: métodos de análise de fármacos. 4. Medicação parenteral. I. Koester, Letícia Scherer. II. Título.

CDU: 615.4

Bibliotecária responsável:  
Margarida Maria Cordeiro Fonseca Ferreira – CRB 10/480

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Desenvolvimento Galênico e Central Analítica, da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Com financiamento do CNPq. O autor recebeu bolsa de estudos da CAPES



À Jerusa, amor de quase toda minha vida

À meus pais Albino e Marlene pelas lições de vida e simplicidade

Aos meus irmãos Marcelo e César pelo apoio constante

À Lisiane e Yuri, que ajuizaram meus irmãos

Ao meu sobrinho predileto Lucas





## **Agradecimentos**

A minha orientadora, Professora Dr<sup>a</sup>. Leticia Scherer Koester, pela confiança, orientação, incentivo e, sobretudo pela acolhida pela qual serei sempre grato.

Ao professor Dr. Hélder Ferreira Teixeira pela ajuda e pelas importantes considerações.

Aos professores Dr. Pedro Ros Petrovick, Dra. Valquíria Linck Bassani, Dr. Paulo Mayorga e Dr. George González Ortega, pela contribuição profissional e ética.

Aos amigos de laboratório, um agradecimento mais do que especial pelo aprendizado e pela amizade, em especial, Alexandre, Ana Paula, Bethânia, Cristiane, Daiane, Débora, Francini, Greice, Gustavo Borre, Janine, Juliana, Karine, Lísias, Maria Paula, Romeu, Samuel, Silvia, Ueiler, Vinicius.

Em particular, Cabral, Laura, Raquel, Regina, Rômulo, Simone e Tiago pelo companheirismo e ajuda técnica.

Aos bolsistas de iniciação científica: Pedro Resende e Hemiliano pela parceria.

À todos os colegas e professores deste programa de Pós-Graduação pela convivência e disponibilidade sempre que necessário.

Ao professor Dr. José Aparício Funck que me incentivou no retorno à atividade acadêmica.

A todos aqueles que, direta ou indiretamente, participaram da realização desta importante etapa da minha vida.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela bolsa de mestrado concedida. Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo suporte financeiro do projeto.



*“Agora compreendia tudo... sabia ter em meu bolso centenas de milhares de figurinhas do jogo da vida, suspeitava emocionado o sentido, tinha a intenção de iniciar de novo o jogo, de voltar a estremecer diante de seus desatinos, de voltar a percorrer...”*

**Hermann Hesse**



## RESUMO

A talidomida é um composto racêmico derivado do ácido glutâmico. A talidomida é aprovada para o tratamento das manifestações agudas cutâneas de eritema nodoso hansênico ou prevenção de recorrências (tipo II), para o tratamento de úlceras aftosas, mieloma múltiplo e doenças crônicas degenerativas (como a doença do enxerto contra hospedeiro e lúpus). Em várias dessas condições, a administração intravenosa da talidomida seria vantajosa, porém, a talidomida possui limitações que dificultam sua administração por essa via, tais como a baixa solubilidade em água e hidrólise dependente do pH. Neste contexto, nanoemulsões aparecem como uma alternativa farmacotécnica passível de alcançar este propósito. Este estudo teve como objetivo desenvolver nanoemulsões destinadas à administração intravenosa de talidomida. Na primeira parte do estudo, foi desenvolvido e validado um método por cromatografia líquida de alta eficiência, a fim de determinar o conteúdo de fármaco e de monitorar sua estabilidade nas formulações desenvolvidas. O método mostrou-se específico, linear ( $r^2 > 0,9998$ ), preciso (R.S.D.  $< 1,33\%$ ), exato (a recuperação variou de 99,6 a 100,3 %) e robusto. Na segunda parte, foram preparadas diferentes formulações utilizando o método de emulsificação espontânea. A formulação base para este estudo consistia de 10 % de óleo de rícino, 3% de lecitina de soja e 2,5% de agente isotonzante. Inicialmente otimizou-se a dose a ser incorporada de talidomida (0,1 - 0,5 mg/g). A partir da avaliação da aparência física, do tamanho de gotícula, do potencial zeta e do conteúdo de fármaco durante período de estocagem de 60 dias, concluiu-se que a formulação que apresentou as melhores características foi a que continha 0,1 mg/g de talidomida. O emprego de maiores concentrações de talidomida resultou no aparecimento de precipitados cristalinos do fármaco após 7 dias de preparação. A etapa posterior consistiu em melhorar a estabilidade desta formulação com adição de tensoativo hidrofílico polissorbato 80, testado em concentrações de 0,5 a 4 %. Através desse estudo constatou-se que a concentração de 0,5 % de polissorbato 80 foi a única que promoveu aumento da estabilidade da formulação. Esta formulação manteve suas propriedades em todo o período de avaliação (60 dias), ou seja, tamanho de gota de cerca de 200 nm, teor em torno de 95 % e potencial zeta em torno de -30 mV. A microscopia eletrônica de transmissão revelou micelas quase esféricas, confirmando os resultados de diâmetro de gotícula obtidos por espectroscopia de correlação de fótons. O estudo de liberação *in*

*vitro*, realizado por meio da técnica de diálise reversa, demonstrou que o perfil de liberação do fármaco a partir da nanoemulsão é melhor descrito pelo modelo de higuchi e é idêntico ao de uma solução deste em acetonitrila. Na terceira e última parte do trabalho, foi realizada a caracterização dos precipitados cristalinos encontrado nas formulações que continham 0,05 % (p/p) de talidomida por meio das técnicas de microscopia ótica, calorimetria exploratória diferencial, infravermelho e difração de raios-X. As amostras analisadas foram caracterizadas como o polimorfo alfa, diferentemente do polimorfo inicialmente utilizado para o preparo das formulações (beta). Verificou-se também que formulações preparadas com o polimorfo alfa resultaram igualmente na precipitação de cristais alfa, mas que a solubilidade da talidomida no núcleo oleoso não é afetada pelo tipo de polimorfo empregado.

Palavras-chave: talidomida, nanoemulsão, parenteral

## ABSTRACT

Thalidomide is a racemic compound derived from glutamic acid. Thalidomide is approved for the management of acute cutaneous manifestations of erythema nodosum leprosum or prevention of recurrence (type II), for the treatment of aphthous ulcers, multiple myeloma and chronic degenerative diseases (such as chronic graft versus host and lupus). In many of these conditions the intravenous administration of thalidomide would prove advantageous, however, thalidomide limited solubility in water and hydrolysis pH dependent impair its administration by this route. In this context, nanoemulsions seem to be interesting formulations to achieve this purpose. This study aimed to develop nanoemulsions for the parenteral administration of thalidomide. In the first part of the study, a high performance liquid chromatographic method was developed and validated in order to determine thalidomide content as well as to monitor its stability in the developed formulations. The method proved specific, linear ( $r^2 > 0.9998$ ), precise (RSD  $< 1.33\%$ ), accurate (recovery varied from 99.8-100.3 %) and robust. In the second part, different formulations were prepared using the method of spontaneous emulsification. The initial formulation for this study consisted by castor oil (10 %, w/w), soybean lecithin (3 %, w/w) and osmotic agent (glycerol, 2.5 %, w/w). Firstly, the optimization of the thalidomide amount to be incorporated was performed (0.1-0.5 mg/g). From the results of physical appearance, droplet size, zeta potential and drug content during the 60 days of storage, it was concluded that the best formulation, that is, those which presented the best characteristics was that contained 0.1 mg/g of thalidomide. The higher content formulations resulted in drug precipitation after 7 days of nanoemulsion preparation. Afterward, we aimed to improve the stability of this formulation, and the addition of a hydrophilic surfactant (polysorbate 80) at concentrations of 0.5 to 4% was tested. By means of this study, we observed that the use of 0.5% polysorbate 80 improved the stability of the formulation. This formulation kept its properties throughout the evaluation period (60 days), that is, droplet size about 200 nm, drug content around 95 % and zeta potential around -30 mV. The transmission electron microscopy revealed almost spherical droplets, confirming the results of droplet diameter obtained by photons correlation spectroscopy. The *in vitro* release study, performed by reverse dialysis method, showed that the release profile of the drug from the nanoemulsions is best described by the Higuchi model and is identical to that of a acetonitrile solution of thalidomide. The third and last

parte of the work was the characterization of the crystalline precipitates found in the 0.05 % (w/w) thalidomide nanoemulsion by means of the techniques: optical microscopy, differential scanning calorimetry, infrared and X-ray diffraction. The analyzed samples were characterized as the alfa polymorph of thalidomide, differently from the polymorph originally used for nanoemulsions preparation (beta). It could also be observed that formulations prepared with the alfa polymorph lead to the precipitation of alfa crystals, and that the solubility of thalidomide in the oil phase is not affected by the type of polymorph employed.

Keywords: Thalidomide, Nanoemulsion, Parenteral



## LISTA DE TABELAS

<i>CAPÍTULO I: REVISÃO DE LITERATURA</i> .....	9
Tabela 1: Exemplos de emulsões lipídicas para nutrição parenteral .....	22
Tabela 2: Fármacos e Emulsões Lipídicas de uso parenteral .....	24
Tabela 3: Composição dos óleos em ácidos graxos.....	27
<i>CAPÍTULO II: VALIDAÇÃO DE METODOLOGIA ANALÍTICA PARA DOSEAMENTO DE NANOEMULSÕES PARENTERAIS CONTENDO TALIDOMIDA</i> .....	37
Table 1: Plackett-Burman experimental design and results relative to the percentage of Thalidomide to check the robustness of the analytical method by HPLC.....	46
Table 2: Recovery of thalidomide standard solution added to blank emulsion samples ....	49
Table 3: System suitability .....	49
<i>CAPÍTULO III: DESENVOLVIMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE EMULSÕES PARENTERAIS CONTENDO TALIDOMIDA PREPARADAS PELO MÉTODO DE EMULSIFICAÇÃO ESPONTÂNEA</i> .....	53
Table 1: Final composition of nanoemulsions.....	62
<i>CAPÍTULO IV: CARACTERIZAÇÃO DOS CRISTAIS DE TALIDOMIDA OBTIDOS DAS NANOEMULSÕES PARENTERAIS</i> .....	81
Table 1: Comparison of $2\theta$ ( $^{\circ}$ ) values and interplanar distances (d) ( $\text{Å}$ ) of $\alpha$ -, $\beta$ - polymorph, and crystal from nanoemulsion, calculated from characteristic peaks:.....	88



## LISTA DE FIGURAS

<i>CAPÍTULO I: REVISÃO DE LITERATURA</i> .....	9
Fig. 1. Estrutura química da talidomida.....	13
Fig. 2. Ácido linoléico- Óleo de soja, gergelim e algodão .....	25
Fig. 3. Ácido oléico- Óleo de gergelim, açafrão, algodão e oliva .....	26
Fig. 4. Ácido ricinoléico- Óleo de rícino.....	26
Fig. 5. Ácido cáprico- Triglicerídeos de Cadeia média.....	26
Fig. 6. Ácido eicosapentaenóico- Óleo de peixe .....	26
Fig. 7. Fórmula estrutural da alfa-fosfatidilcolina .....	30
<i>CAPÍTULO II: VALIDAÇÃO DE METODOLOGIA ANALÍTICA PARA DOSEAMENTO DE NANOEMULSÕES PARENTERAIS CONTENDO TALIDOMIDA</i> .....	37
Fig. 1. Chromatograms with base shifted samples (organized from top to bottom) at 300 nm: Castor oil, Soy Lecithin, Glycerol, Polissorbate 80, Blank Nanoemulsion, THD Nanoemulsion, Phtalic Acid, Phenacetin and Thalidomide.....	47
Fig. 2. Degradation profile of thalidomide in acid medium .....	48
Fig. 3. Chromatograms of the degradation profile of thalidomide in alkaline medium: (organized from top to bottom) before degradation, 1, 2 and 4 hour after (only peak of phenacetin appears). .....	48
<i>CAPÍTULO III: DESENVOLVIMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE EMULSÕES PARENTERAIS CONTENDO TALIDOMIDA PREPARADAS PELO MÉTODO DE EMULSIFICAÇÃO ESPONTÂNEA</i> .....	53
Fig. 1. Thalidomide solubility in castor oil, MCT, oliva oil, soybean oil and castor oil/MCT 50/50. ....	65

Fig. 2. (A) mean droplet size ( $\pm$ S.D.), (B) polydispersity index ( $\pm$ S.D.) and (C) zeta potential of formulations containing increasing amounts of THD (0.01, 0.015, 0.02 and 0.05 %) (*significantly different (ANOVA, (Tukey test, $p < 0.05$ )).....	66
Fig. 3. Thalidomide content after 1, 7, 45 and 60 days of storage (*significantly different (ANOVA, (Tukey test, $p < 0.05$ )).....	68
Fig. 4. Results for mean droplet size ( $\pm$ S.D.) and polydispersity index values ( $\pm$ S.D.) of formulations containing increasing amounts of polysorbate after 7 days (blank columns and squares) and 60 days (grey columns and diamond) of preparation (*significantly different (Paired Samples (t-test, $p < 0.05$ )).....	69
Fig. 5. Zeta potential results of compositions containing increasing amounts of polysorbate. White columns: measures ( $\pm$ S.D.) after 7 days. Gray columns: measures ( $\pm$ S.D.) after 60 days (*significantly different (Paired Samples (t-test, $p < 0.05$ )).....	69
Fig. 6. Thalidomide content after 45 days of storage (*significantly different (ANOVA, (Tukey test, $p < 0.05$ )).....	70
Fig. 7. Transmission electron photomicrograph of the THD nanoemulsion with polysorbate 0.5%: A, 300Kx, and B, 500Kx; Blank nanoemulsion with polysorbate 0.5%: C, 300Kx, and D, 300Kx. ....	71
Fig. 8. <i>In vitro</i> dissolution profiles of optimized nanoemulsion (dotted lines) and THD dissolved in acetonitrile (black line) using bulk-equilibrium reverse dialysis sac technique. Mean $\pm$ S.D; n=3. ....	72
Fig. 9. Linear simulated profile of THD. From top to bottom: dotted line: oral dose of 200 mg; thick line: 2-h i.v. infusion of 25 mg, and thin line: oral dose of 25 mg. The following parameters were used in the simulations: 25 mg i.v. ( $k_e = 0.143 \text{ h}^{-1}$ ; $V_d = 20 \text{ L}$ ), 25 mg oral [ $k_{\text{fast}} = 0.23 \text{ h}^{-1}$ ; $k_{\text{slow}} = 0.639 \text{ h}^{-1}$ (fast absorption); $V_d = 20 \text{ L}$ ], 200 mg oral [ $k_{\text{fast}} = 0.23 \text{ h}^{-1}$ ; $k_{\text{slow}} = 0.077 \text{ h}^{-1}$ (slow absorption); $V_d = 20 \text{ L}$ ].....	73
CAPÍTULO IV: CARACTERIZAÇÃO DOS CRISTAIS DE TALIDOMIDA OBTIDOS DAS NANOEMULSÕES PARENTERAIS.....	81

Fig. 1. Photomicrographs of THD crystals in 400x magnification: A, bulk $\alpha$ -polymorph; B, bulk $\beta$ -polymorph; C, nanoemulsion crystals .....	86
Fig. 2. DSC results from bulk materials and nanoemulsion crystals .....	86
Fig. 3. FTIR spectra of thalidomide $\beta$ -polymorph, $\alpha$ -polymorph and nanoemulsion crystals.....	87
Fig. 4. XRD diffractograms of $\beta$ -polymorph, $\alpha$ -polymorph and nanoemulsion crystals. ....	88
Fig. 5. THD polymorphs solubility in oils. *significantly different (ANOVA, Tukey test, $p < 0.05$ ). .....	89



## LISTA DE ABREVIATURAS

A/O	Água em óleo
CLAE ou HPLC	Cromatografia Líquida de alta eficiência
DSC	Calorimetria exploratória diferencial
ENH	Eritema Nodoso Hansênico
FT-IR	Fourier Transformed Infrared
IR	Infrared
MET	Microscopia Eletrônica de Transmissão
MEV	Microscopia Eletrônica de Varredura
NE	Nanoemulsão
O/A	Óleo em água
p/p	Peso/peso
p/v	Peso/volume
PI	Índice de polidispersidade
TCM ou MTC	Triglicerídeos de cadeia média
TG	Termogravimetria
THD	Talidomida
UV	Ultravioleta
v/v	Volume/volume





## SUMÁRIO

INTRODUÇÃO.....	1
OBJETIVOS.....	5
Objetivo geral:.....	7
Objetivos específicos:.....	7
<i>CAPÍTULO I: REVISÃO DE LITERATURA</i> .....	9
3.1.1 Histórico.....	11
3.1.2 Propriedades físico-químicas.....	13
3.1.3 Mecanismos de ação.....	15
3.1.4 Usos aprovados.....	17
3.1.5 Reações adversas.....	18
3.1.6 Farmacocinética.....	19
3.2 Nanoemulsões.....	20
3.3 Formulação de emulsões parenterais.....	25
3.3.1 Óleos.....	25
3.3.2 Emulsificantes ou tensoativos.....	28
3.3.3 Outros componentes.....	32
3.4 Métodos de preparação de emulsões submicrométricas.....	32
3.5 Caracterização e controle de qualidade de emulsões submicrométricas.....	34
3.5.1 Diâmetro de gotícula.....	34

3.5.2 Potencial zeta .....	35
3.5.3 Avaliação físico-química do sistema nanoemulsionado.....	36
<i>CAPÍTULO II: VALIDAÇÃO DE METODOLOGIA ANALÍTICA PARA DOSEAMENTO DE NANOEMULSÕES PARENTERAIS CONTENDO TALIDOMIDA .....</i>	<i>37</i>
Determination of thalidomide in parenteral nanoemulsions: development and validation of an HPLC method .....	39
ABSTRACT.....	41
1. Introduction .....	43
2. Experimental.....	43
2.1. <i>Chemicals and reagents</i> .....	43
2.2. <i>Apparatus and chromatographic conditions</i> .....	44
2.3. <i>Standard solutions</i> .....	44
2.4. <i>Sample preparation</i> .....	44
2.5. <i>Method validation</i> .....	45
3. Results and discussion .....	46
4. Conclusions .....	50
Acknowledgements.....	50
References .....	51
<i>CAPÍTULO III: DESENVOLVIMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE EMULSÕES PARENTERAIS CONTENDO TALIDOMIDA PREPARADAS PELO MÉTODO DE EMULSIFICAÇÃO ESPONTÂNEA .....</i>	<i>53</i>

Development and characterization of parenteral nanoemulsions containing thalidomide prepared by spontaneous emulsification method .....	55
A B S T R A C T.....	57
2. Materials and methods.....	60
2.1 <i>Materials and reagents</i> .....	60
2.2 <i>High-performance liquid chromatographic analysis</i> .....	60
2.3 <i>Determination of THD solubility in different oils</i> .....	61
2.4 <i>THD nanoemulsions preparation</i> .....	61
2.5 <i>Characterization THD nanoemulsions</i> .....	62
2.5.1 <i>Particle size analysis</i> .....	62
2.5.2 <i>Zeta potential measurement</i> .....	63
2.5.3 <i>THD assay</i> .....	63
2.5.4 <i>Transmission Electronic Microscopy</i> .....	63
2.5.5 <i>Viscosity</i> .....	63
2.6 <i>In vitro dissolutions studies</i> .....	63
2.7 <i>Simulation of the in vivo profile of the optimized THD nanoemulsion</i> .....	64
2.8 <i>Statistical Analysis</i> .....	65
3. Results and discussion .....	65
3.1 <i>Determination of THD solubility in oils</i> .....	65
3.2 <i>Preparation of THD nanoemulsions</i> .....	66
3.3 <i>Optimization of THD nanoemulsions with respect to the co-emulsifier content</i> .....	68

3.4 THD release from optimized nanoemulsion .....	71
3.5 Simulation of the pharmacokinetic profile of the optimized formulation. ....	73
4. Conclusions .....	74
Acknowledgements.....	75
References .....	75
<i>CAPÍTULO IV: CARACTERIZAÇÃO DOS CRISTAIS DE TALIDOMIDA OBTIDOS DAS NANOEMULSÕES PARENTERAIS</i> .....	81
Characterization of thalidomide crystals obtained from parenteral nanoemulsions .....	83
A B S T R A C T.....	83
Acknowledgements.....	90
References .....	90
DISCUSSÃO DOS RESULTADOS.....	93
CONCLUSÕES.....	99
REFERÊNCIAS .....	103

## INTRODUÇÃO

---



A talidomida foi introduzida como fármaco sedativo no final de 1950. Em 1961, foi removida do mercado farmacêutico, devido a sua teratogenicidade e neuropatia. O uso terapêutico deste fármaco como sedativo recomeçou em 1965, com o seu emprego em pacientes com eritema nodoso hansênico (ENH), pelo médico Jacob Sheskin (Eriksson *et al.*, 2001; Borges e Fröhlich, 2003). Além da atividade sedativa esperada, verificou-se que os sinais clínicos e os sintomas do ENH também tinham sido atenuados após 48h do uso da talidomida. Vários relatos registram a utilização deste fármaco logo após sua proibição, tais como de Field e colaboradores (1966), que descrevem o grau de redução da esplenomegalia como indicador da ação da talidomida sobre a doença do enxerto versus hospedeiro, além da potencial utilização em células tumorais (Braun *et al.*, 1979).

Em 1994, D'amato e colaboradores relatam pela primeira vez o mecanismo antiangiogênico da talidomida, demonstrando que este fármaco poderia ser utilizado para doenças dependentes da angiogênese, como determinados tipos de tumores.

Com a descoberta dos potenciais mecanismos imunomodulatório e antiinflamatório da talidomida, criaram-se novas perspectivas para a sua utilização, mesmo que estes ainda não estejam completamente esclarecidos (Franks *et al.*, 2004). A aplicação clínica deste fármaco tem demonstrado êxito no tratamento de quadros de úlcera aftosa (Jacobson *et al.*, 1999), em condições inflamatórias e infecciosas ligadas a dermatologia tais como lupus eritematoso (Atra *et al.*, 1993), em patologias ligadas ao HIV, como a caquexia (Borges e Fröhlich, 2003), no mieloma múltiplo (Singhal *et al.*, 1999), entre outras.

No Brasil, o emprego da talidomida na terapêutica teve reinício em 15 de agosto de 1997 (BRASIL, 1997), quando a Agência Nacional de Vigilância Sanitária regulamentou o registro, produção, fabricação, comercialização, exposição à venda, prescrição e dispensação dos produtos à base de talidomida. Em 2003, foi sancionada a Lei nº 10.651, de 16 de abril de 2003 (BRASIL, 2003), que dispõe sobre o controle do uso da talidomida. Em 2007, a talidomida foi retirada da Relação Nacional dos Medicamentos Essenciais (BRASIL, 2007), sendo disponibilizada somente em programas de saúde do governo.

Diante de tais informações, nota-se um aumento das aplicações e potencialidades da talidomida no tratamento de diversas doenças, mesmo com seu uso restrito e controlado (Brasil, 2003). Entretanto, até o presente momento, o fármaco está disponível para administração apenas pela via oral, o que apresenta diversos inconvenientes (Krenn *et al.*, 1992). Na doença enxerto contra hospedeiro (Krenn *et al.*, 1992), a administração de talidomida via oral é prejudicada por lesões intestinais que diminuem a capacidade de absorção. Outros casos envolvem pacientes com ulcerações esofágicas e orofaríngeas que apresentam deglutição dolorosa (Jacobson *et al.*, 1999) e também pacientes cuja administração oral é dificultada por estados de inconsciência (sepsis) (Schmidt *et al.*, 1996).

Nestes casos, especificamente, a melhor via de administração seria a intravenosa, mas a talidomida possui limitações que dificultam a sua administração por esta via, tais como a baixa hidrossolubilidade ( $0,050 \text{ mg.ml}^{-1}$ ) (Goosen *et al.*, 2002) e hidrólise espontânea dependente de pH (Eriksson *et al.*, 1998).

Na literatura, têm sido relatados a complexação da talidomida com ciclodextrinas, ou a utilização dos enantiômeros puros, como estratégias de viabilização parenteral da talidomida (Krenn *et al.*, 1992; Eriksson *et al.*, 2000). No presente trabalho, a veiculação da talidomida em nanoemulsões, ora inédito, é proposta como estratégia farmacotécnica para a administração do fármaco por esta via.

As nanoemulsões vêm sendo investigadas há várias décadas como sistema de liberação para a administração intravenosa de fármacos pouco hidrossolúveis devido à sua, biocompatibilidade, biodegradabilidade e baixa toxicidade (Benita e Levy, 1993; Constantinides *et al.*, 2008; Tadros *et al.*, 2004). Estas formulações, que possuem tamanho de gotícula submicrométrico e, portanto, compatível com a administração intravenosa, podem ser obtidas por diversas técnicas. No presente trabalho, o método de preparo escolhido foi a emulsificação espontânea, por tratar-se de um método simples, de menor custo, rápido e que permite preparar pequenos lotes de formulação em temperaturas inferiores àsquelas utilizadas pelas outras técnicas (Yu *et al.*, 1993; Bouchemal *et al.*, 2004; Almeida *et al.*, 2008).



## **OBJETIVOS**

---



## **Objetivos**

### **Objetivo geral:**

- Desenvolver nanoemulsões contendo talidomida visando à administração parenteral do fármaco.

### **Objetivos específicos:**

- Desenvolver e validar metodologia analítica por cromatografia líquida de alta eficiência para análise da talidomida nas formulações desenvolvidas;
- Avaliar a solubilidade da talidomida em diferentes óleos e selecionar aquele(s) em que o fármaco apresenta a maior solubilidade visando à preparação das emulsões;
- Investigar a viabilidade de desenvolvimento de nanoemulsões contendo talidomida pela técnica de emulsificação espontânea e selecionar os demais excipientes adequados à preparação das formulações;
- Caracterizar as formulações obtidas quanto as suas propriedades físicas, químicas e físico-químicas, bem como avaliar sua estabilidade sob refrigeração ou 4°C;
- Investigar o perfil de liberação *in vitro* do fármaco a partir das emulsões utilizando o método de diálise reversa;
- Simular o Perfil Farmacocinético *in vivo*, utilizando software Scientist®;
- Avaliar a influência do polimorfismo da talidomida no desenvolvimento das nanoemulsões.



***CAPÍTULO I:***

**REVISÃO DE LITERATURA**

---



### 3.1 Talidomida

#### 3.1.1 Histórico

A talidomida foi descoberta acidentalmente por Wilhelm Kunz em 1953 nos laboratórios da indústria farmacêutica “Chemie Grünenthal”, quando este preparava peptídeos simples para a produção de antibióticos. Herbert Keller, farmacologista do laboratório, reconheceu a substância como análogo estrutural da glutetimida, fármaco sedativo hipnótico (Lima *et al.*, 2001; Erickson *et al.*, 2001).

Em outubro de 1957, o fármaco começou a ser comercializado na Alemanha pela mesma indústria farmacêutica sob o nome de “Contergan”, sendo posteriormente liberado para uso em mais de 46 países (Grünenthal, 2010). Em 1959 ocorreu o primeiro relato de efeito adverso relacionando a talidomida, um caso de polineurite (Grünenthal, 2010). Em 1960, Frances Kelsey (Kelsey, 1988), como médica revisora do FDA (Food and Drug Administration), solicitou estudos mais aprofundados sobre os efeitos adversos do fármaco sobre o sistema nervoso central antes de liberá-lo para utilização em território norte americano. Este posicionamento, após deflagração do potencial teratogênico, fortaleceu o FDA como agência reguladora de medicamentos.

Em novembro de 1961, um pediatra alemão e um ginecologista australiano, respectivamente, Doutor Widukind Lenz (Lenz *et al.*, 1962) e William McBride (1961), divulgam quase simultaneamente as primeiras suspeitas relacionando talidomida com deformidades em fetos. Neste mesmo mês, a “Chemie Grünenthal” foi pressionada a retirar o “Contergan” do mercado alemão.

Em 1962, como resposta ao “desastre da Talidomida”, foi aprovada nos Estados Unidos uma nova emenda no Federal Food, Drug, and Cosmetic Act chamada “Kefauver-Harris”, que introduziu a necessidade de provas científicas de eficácia e segurança dos fármacos em fase experimental antes de estes serem testados em humanos (Kelsey, 1988; Lenz, 1988).

A talidomida seguiu sendo utilizada no Brasil até 1965, mesmo 4 anos depois de ter sido banida em grande parte dos países (ABPST, 2007).

Em 1965, surgiram os primeiros estudos (Drobeck *et al.*, 1965; Fratta *et al.*, 1965), evidenciando a teratogenicidade da talidomida em coelhos da raça Nova Zelândia, demonstrando que o modelo anterior, em rato, não refletia a toxicidade exercida sobre os humanos. Neste mesmo ano, o médico Jacob Sheskin descobriu a eficácia da talidomida no tratamento da Hanseníase (Sheskin, 1965).

Pesquisa na base de dados SCOPUS® com a palavra chave “Thalidomide” no período compreendido entre 1965 e meados de 1980 demonstra que grande parte dos estudos envolvendo a talidomida era relacionada à condição de embriopatia, estudos sobre o provável mecanismo teratogênico, elucidação estrutural, estabilidade química e, principalmente, hanseníase.

A partir de 1980 destacam-se estudos da talidomida em lúpus eritematoso (Gatti *et al.*, 1986), doença de Behçet (Hamza, 1986) e outras doenças com características auto-imunes (Hendler e McCarty, 1983).

Vogelsang e colaboradores (1986) publicaram estudos utilizando a talidomida no tratamento da reação enxerto versus hospedeiro (REVH). A hipótese dos autores era de que a talidomida atuaria sobre mecanismos de inibição de precursores citotóxicos.

A partir de 1990, pesquisadores começam a demonstrar evidências de que a talidomida possui atividade antiangiogênica, efeitos antiinflamatórios e de atuação no sistema imunológico (D'amato *et al.*, 1994; Gutierrez-Rodriguez *et al.*, 1989; Grinspan *et al.*, 1989; Ehrlich, 1989; Heney *et al.*, 1990; Heney *et al.*, 1991; Randall *et al.*, 1990; Avgerinou *et al.*, 1990).

Em 1997, FDA aprovou a comercialização da talidomida (Thalomid) produzida pela Celgene, de forma restrita a pacientes cadastrados no programa oficial chamado S.T.E.P.S. (System for Thalidomide Education and Prescribing Safety) para tratamento do eritema nodoso hanseniano (ENH) e mieloma múltiplo (FDA, 1998; Celgene, 2008; Zeldis *et al.*, 1999).

No Brasil, a talidomida é um medicamento controlado, regulamentado pela portaria 344/98 (Brasil, 1998), classificado como imunossupressor, classe C3. O uso da talidomida é aprovado desde 1997 para o tratamento do ENH, no controle e prevenção de



úlceras aftóides idiopáticas nos pacientes portadores de HIV/AIDS, bem como no tratamento de algumas doenças crônico-degenerativas (lúpus eritematoso, doença enxerto-versus-hospedeiro) (Brasil, 1997; Brasil, 2002; Borges e Fröhlich, 2003; FUNED, 2008).

A RDC nº 34, aprovada em 20 de abril de 2000, libera o uso da talidomida para casos de mieloma múltiplo, refratários à quimioterapia antineoplásica. Em 2002, pela Portaria Conjunta nº 25, com a finalidade de racionalizar o uso da talidomida, aprovou-se os protocolos clínicos e diretrizes terapêuticas para o uso em Doença Enxerto Contra Hospedeiro (DECH) lúpus eritematoso sistêmico e mieloma múltiplo (Brasil, 2000; Brasil, 2002).

Em 2003, foi sancionada lei nº 10651, que dispõe sobre o controle do uso da talidomida, restringindo a sua utilização e distribuição (BRASIL, 2003). Em 2007 (BRASIL, 2007), a talidomida foi retirada da RENAME, sendo, desde então, utilizada somente em programas específicos do governo.

### 3.1.2 Propriedades físico-químicas

A talidomida, [(±)2-(2,6-dioxo-3-piperidinil)-1H-isoindol-1,3-(2H)-diona; (±)-ftalimidoglutarimida; ±- α- (N-phthalimido) glutarimida; C<sub>13</sub>H<sub>10</sub>N<sub>2</sub>O<sub>4</sub>] (Figura 1), é um composto racêmico derivado do ácido glutâmico.

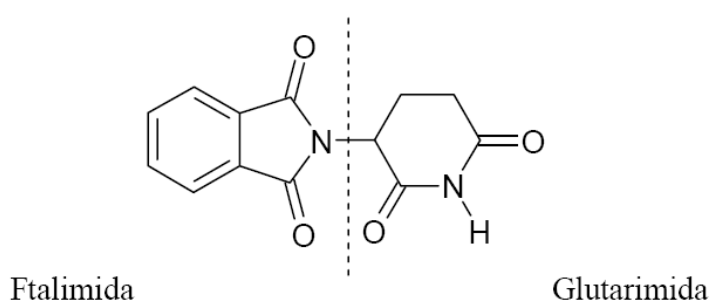


Fig. 1. Estrutura química da talidomida (Fonte: Borges e Fröhlich, 2003)

A estrutura da glutarimida contém o único centro assimétrico e existe em duas formas opticamente ativas designadas de S-(-) ou R-(+) (Borges e Fröhlich, 2003; RxList,

2008). A talidomida é, portanto, um racemato que consiste de quantidades equimolares de enantiômeros (+)-(R)-e (-)-(S)-talidomida.

Os enantiômeros apresentam efeitos farmacológicos distintos. Os efeitos teratogênicos e imunomoduladores da talidomida ocorrem devido ao (S)-enantiômero, enquanto o efeito sedativo é atribuído ao (R)-enantiômero. Mesmo havendo esta diferenciação, o desenvolvimento de uma formulação utilizando a forma pura do (R)-enantiômero como fármaco é inviabilizada pela interconversão quiral em humanos, catalisada pela albumina (Erickson *et al.*, 1998; Hoglund *et al.*, 1998).

A talidomida é um pó cristalino branco estável, com peso molecular de 258,2 e ponto de fusão de 275-278 °C (Teo *et al.*, 2004). O fármaco é pouco hidrossolúvel (50 µg/mL em pH 6,4 a 25°C e 61,4 µg/mL em pH 6,4 a 32° C) e seu coeficiente de partição octanol-água (log P) é cerca de 0,5 a 0,7 (Goosen *et al.*, 2002; Teo *et al.*, 2004; Eriksson *et al.*, 2000).

O fármaco é estável em formas sólidas, mas hidrolisa espontaneamente em soluções com pH igual ou acima de 6,0, produzindo pelo menos 13 produtos de hidrólise (Schumacher *et al.*, 1965). Estes produtos são também transformados rendendo numerosos compostos opticamente ativos. Já foi demonstrado que a acidificação de amostras biológicas contendo talidomida (pH 4,0 - 5,5) aumenta significativamente a sua estabilidade (Eriksson *et al.*, 2000; Teo *et al.*, 2002 e 2004).

Através dos estudos de Hargreaves e colaboradores (1970) e Schumacher e colaboradores (1965), constatou-se que a ftalimida e a glutarimida, os principais grupamentos da talidomida, sob hidrólise básica, apresentam reação que parece ser de segunda ordem na faixa de pH entre 7 e 10 e acima desta faixa a abertura destes anéis são quase independentes da concentração dos íons hidroxila devido a natureza ácida do hidrogênio ligado ao nitrogênio do grupamento imidico, tanto da glutarimida como da ftalimida.

A hidrólise ácida é dependente de condições mais drásticas; para a formação de ácido ftálico existe a necessidade de aquecimento com ácidos minerais fortes. Esta é uma reação característica na qual as imidas N substituídas em meio aquoso com ácidos

minerais fortes se hidrolisam em ácidos e aminas primárias. O mecanismo de reação envolve ataque nucleofílico da água na carboxila do ácido conjugado instável da imida (Hargreaves *et al.*, 1970).

Além do aspecto químico, a talidomida apresenta-se na forma cristalina de 2 polimorfos, denominados  $\alpha$  e  $\beta$  ou III e I. Esta característica, relatada há mais de dez anos na literatura (Caira *et al.*, 1994; Reepmeyer *et al.*, 1994; Carini *et al.*, 2008), pode ter um papel importante na biodisponibilidade. Mais recentemente, Lara-Ochoa e colaboradores (2006) descrevem ainda a existência de uma nova forma polimórfica, designada  $\beta^*$ , que exibiria enantiotropia com as duas formas.

### 3.1.3 Mecanismos de ação

A partir de 1990, estudos envolvendo citocinas antiinflamatórias demonstraram que a talidomida possui uma inibição seletiva, atuando especificamente sobre TNF $\alpha$  (Fator de Necrose Tumoral alfa) produzida por monócitos sem afetar a síntese ou expressão de outras citocinas relacionadas a estas células (Sampaio *et al.*, 1991; Moreira *et al.*, 1993).

Em 1994, D'Amato e colaboradores comprovaram um dos prováveis mecanismos de atividade antiangiogênica da talidomida, demonstrando, a partir de ensaios com microbolsa em córnea de coelhos e camundongos, que a talidomida quando administrada oralmente inibe a neovascularização por bloqueio do fator básico de crescimento do fibroblasto (bFGF) e do fator de crescimento do endotélio vascular (VEGF). Em 1997, Kenyon e colaboradores, demonstraram que este mecanismo está associado principalmente ao enântiômero S, responsável também pela teratogênese. Através de relação estrutura-atividade, os produtos de degradação da hidrólise espontânea também teriam efeito antiangiogênico.

Diante dos possíveis efeitos, de sedação a imunomodulação, a atividade da talidomida não se restringe unicamente a um sistema, podendo atuar em todo o organismo. Na pele, por exemplo, favorece a proliferação dos queratinócitos através da interleucina 8 melhorando a cicatrização do epitélio. Atua sobre o processo de fagocitose,

inibindo a atividade fagocítica dos monócitos e neutrófilos, via receptores de superfície (Paravar e Lee, 2008).

A atividade antiinflamatória pode estar relacionada à inibição de secreção da Prostaglandina E2 (PGE2) via desestabilização do ARNm da enzima ciclooxigenase 2 (COX2) (Paravar e Lee, 2008; Faver e colaboradores 2005; Jin e colaboradores 2007).

Grande parte das pesquisas envolvendo pacientes com eritema nodoso hansênico, HIV-1 e tuberculose demonstram que a talidomida atua na produção do fator de necrose tumoral alfa (TNF $\alpha$ ), mas falta um consenso relacionado à diminuição deste fator, pois a presença desta citocina mesmo em níveis elevados ocorre também em pacientes que demonstraram diminuição dos sintomas (Penna *et al.*, 2005; Okafor, 2003; Ravot *et al.*, 1999; Fu e Fu-Liu, 2002; Paravar e Lee, 2008).

A talidomida aumenta a secreção do ativador das células NK (natural Killer) induzindo uma resposta imune antitumor. Atua nas células tumorais por mecanismo de apoptose além de inibir produção de anticorpos e ativar as células T (Kawamata *et al.*, 2006; Anderson, 2005; Invernizzi *et al.*, 2005; Davies *et al.*, 2001).

O fator nuclear  $\kappa$  B (NF- $\kappa$ B) é relacionado a transcrição de DNA. A inibição deste fator está relacionada à diminuição da resposta inflamatória em modelos animais. A talidomida atua neste fator de transcrição de forma indireta através de supressão da atividade de I $\kappa$ B quinase, enzima responsável pela fosforilação da I $\kappa$ B  $\alpha$  resultando em dissociação do NF- $\kappa$ B, ativando-o (Keifer e colaboradores, 2001).

Falta um consenso definitivo sobre a talidomida e todos os seus mecanismos de ação e das possíveis interações entre eles. Diante deste amplo espectro de atividade farmacológica, ressaltando as atividades nos receptores celulares de superfície (CD14, CD11b/CD18), TNF $\alpha$ , interferon, interleucina 8, interleucina 10, interleucina 12, ciclooxigenase 2 (COX-2), células NK (natural killers) e possivelmente sobre o fator nuclear  $\kappa$  B (NF- $\kappa$ B) (Paravar e Lee, 2008; Franks *et al.*, 2004) pode-se concluir que há ainda um vasto campo de aplicações experimentais e farmacológicas para a talidomida, além dos usos aprovados até o momento.

### 3.1.4 Usos aprovados

Na reação hansênica do tipo eritema nodoso ou tipo II, a talidomida é utilizada para manifestações cutâneas moderadas a grave. Não é recomendada como monoterapia quando há presença de neurite moderada a grave. É a terapia de primeira linha para graus moderado a severo, e no caso do eritema nodoso recidivante, é utilizada como terapia de manutenção para prevenção e supressão das manifestações (BRASIL, 1997; BRASIL, 2000; BRASIL, 2003; FUNED, 2008; Franks *et al.*, 2004).

A talidomida é utilizada em úlceras aftosas, em pacientes infectados ou não pelo HIV, que não respondem ao tratamento com colchicina, dapsona e corticosteróides. A infecção causadora da lesão deve ser excluída antes de considerar o tratamento com a talidomida (FUNED, 2008).

No caso do Mieloma Múltiplo (MM), estudos demonstram que a redução de dose pode resultar em eficácia similar quando comparado com altas doses e o uso combinado com outros agente anti-MM pode aumentar sua potência (dexametasona). Ainda, a talidomida seria ativa contra Mieloma avançado, produzindo respostas acentuadas e duráveis em alguns pacientes com mieloma múltiplo incluindo os reincidentes de quimioterapia em altas doses (BRASIL, 2000; Celgene, 2008; Haas *et al.*, 2008; Dimopoulos *et al.*, 2001; Singhal *et al.*, 1999).

É aprovado seu uso no tratamento da reação enxerto versus hospedeiro (REVH), embora não haja dados conclusivos sobre a eficácia, este problema poderia estar diretamente relacionado ao problema de absorção devido a extensivas erosões do trato digestivo ocasionadas pela reação (Vogelsang e Higman, 2004; Krenn *et al.*, 1992; FUNED, 2008).

Devido ao mecanismo autoimune envolvido, alguns estudos demonstram a eficácia talidomida no tratamento do lupus eritematoso. Ainda existe a necessidade de comprovação de que os efeitos da terapia sobrepõem às reações adversas, principalmente neuropatia periférica e teratogênese, mas o uso da talidomida é aprovado para esta doença (Housman *et al.*, 2003; Karim *et al.*, 2001).

### 3.1.5 Reações adversas

Grande parte dos estudos clínicos utiliza o protocolo do National Cancer Institute (2006), chamado de “Cancer Therapy Evaluation Program”, onde os eventos adversos são graduados de Zero a Cinco, sendo grau Zero relacionado a nenhum evento adverso ou dentro dos limites normais, e grau Cinco a evento adverso fatal (Singhal *et al.*, 1999; Dimopoulos *et al.*, 2001; Weber *et al.*, 2003; Srinivas e Guardino, 2005).

Conforme Singhal e colaboradores (1999), efeitos adversos foram relatados por pelo menos 10 por cento dos pacientes na maioria das diferentes doses. Relatos de efeitos adversos grau 3 ou 4 não foram freqüentes (menos do que 10% em todos casos). Menos que 5 por cento dos pacientes tiveram grau 1 ou 2 de leucopenia em qualquer dose, e efeitos adversos de grau 3 ou 4, de trombocitopenia ou anemia ocorreram em somente em 3 pacientes. De forma geral, os eventos adversos mais comuns da talidomida foram grau 1 ou 2 incluindo principalmente sonolência, constipação e fadiga (Dimopoulos *et al.*, 2001; Weber *et al.*, 2003; Srinivas e Guardino, 2005).

Além da teratogenicidade, já muito bem documentada, os efeitos adversos mais freqüentes associados à talidomida são a sedação, seguida da neuropatia periférica. No estudo de Teo *et al.* (2004), os efeitos adversos foram associados ao regime terapêutico (dose única ou múltipla). No caso de dose única de 200 mg, os eventos adversos incluíram sedação, vertigem e dor de cabeça. Em doses múltiplas de 200 mg/dia por 3 semanas, foram relatados, além destes efeitos, constipação, formigamento e boca seca (Teo *et al.*, 2004; Scheffler *et al.*, 2000; Trapnell *et al.* 1998).

A bula do medicamento Talidomida comprimido 100 mg, produzido pela FUNED, classifica as reações adversas por incidência e por sistemas. Relata sua teratogenicidade e ressalta o risco extremamente alto de nascimentos com malformações, especialmente focomelia ou morte fetal durante o período crítico da gestação (entre a 3<sup>a</sup> e 8<sup>a</sup> semana). Estudos realizados contra-indicam a utilização da Talidomida em todo o período de gestação (Franks *et al.*, 2004).

### 3.1.6 Farmacocinética

A baixa solubilidade em água, tanto da mistura racêmica como dos enantiômeros puros, e instabilidade química em pH fisiológico, além de impedir um estudo detalhado de sua farmacocinética também dificulta o uso intravenoso da talidomida, e conseqüentemente, determinação experimental de sua biodisponibilidade absoluta (Teo *et al.*, 1999; Matthews e McCoy, 2003; FUNED, 2008; Celgene, 2008, Eriksson *et al.*, 2000).

Para uma dose de 200 mg, obtêm-se concentrações plasmáticas máximas ( $C_{max}$ ) entre 1 a 2 µg/ml, com tempo para atingir a concentração máxima ( $T_{max}$ ) que pode variar entre 3 a 4 horas. O tempo de latência é de aproximadamente 30 minutos e a exposição total obtida pela área sob a curva (ASC) é de 18 mg.h/L. A meia-vida de eliminação ( $t_{1/2}$ ) é de 6 horas e a depuração sistêmica aparente de 10L/h (Celgene, 2008; Teo *et al.*, 2004).

A ligação às proteínas plasmáticas é de 55 e 66 % para as formas (+)-R e (-)-S, respectivamente (Celgene, 2008). A talidomida sofre hidrólise não enzimática no plasma, que leva à formação de aproximadamente 13 metabólitos (Matthews e McCoy, 2003; Celgene, 2008; Schumacher e Williams; 1965).

O fármaco apresenta uma depuração renal de 1,15 ml/min com menos que 0,7 % da dose excretada na urina na forma inalterada (Celgene, 2008).

Os valores de  $C_{max}$ ,  $T_{max}$  e  $t_{1/2}$  em pacientes portadores de HIV, que não apresentavam infecções oportunistas ou doenças que pudessem alterar a absorção gastrointestinal, foram similares aos observados por indivíduos saudáveis (Piscitelli *et al.*, 1997). Entretanto, segundo Eriksson e colaboradores (2001), em alguns pacientes, a biodisponibilidade do fármaco estaria diminuída devido a problemas de má-absorção ou absorção não-linear de altas doses. Destacam-se pacientes portadores da Reação-enxerto-versus-hospedeiro (REXH), que apresentaram além da absorção diminuída, uma ampla variação inter-individual. Nestes indivíduos, doses de até 1600 mg/dia, divididas em 4 tomadas, tiveram que ser administradas para se obter picos de concentração plasmática próximos de 5 µg/ml (Zhou *et al.*, 2005; Parker *et al.*, 1995).

A administração concomitante com alimentação rica em lipídios parece não alterar significativamente os valores de área sob a curva (ASC) e  $C_{max}$ , no entanto, aumentam o valor de  $T_{max}$  para aproximadamente 6 horas (Teo *et al.*, 2000; Eriksson *et al.*, 2001; Celgene, 2008).

Cabe ainda mencionar que a dissolução lenta do fármaco no intestino devido a baixa hidrossolubilidade pode levar ao aparecimento do fenômeno de *flip-flop*, isto é, quando a velocidade de eliminação é maior que a velocidade de absorção (Eriksson *et al.*, 2001; Teo *et al.*, 2001; Teo *et al.*, 2004).

### 3.2 Nanoemulsões

Emulsão é um sistema disperso que contém pelo menos duas fases não miscíveis. São termodinamicamente instáveis devido ao excesso de energia livre associada à superfície das gotículas. A tendência física do sistema é a redução de superfície com o aumento do tamanho das gotículas devido à associação destas (Tadros *et al.*, 2004; Tamilvanan, 2009; Schott, 1995).

Normalmente essas emulsões são constituídas de uma fase externa ou contínua e uma fase interna ou dispersa. O tipo de emulsão, óleo em água (O/A) onde a fase externa é aquosa, água em óleo (A/O) onde a fase externa é oleosa ou emulsão dupla ou múltipla (O/A/O e A/O/A) dependerá basicamente das propriedades dos tensoativos, da proporção das fases e da temperatura (Benita e Levy, 1993; Eccleston, 2007, Tamilvanan, 2004).

Nanoemulsões, também denominadas de emulsões lipídicas ou emulsões submicrométricas, são sistemas de aspecto leitoso que possuem tamanho de gotícula menor que 1  $\mu\text{m}$ , em geral de 200 a 500 nm. Ao contrário das microemulsões (que são transparentes ou translúcidas e termodinamicamente estáveis), nanoemulsões são somente cineticamente estáveis, ou seja, apresentam as mesmas limitações relacionadas aos fenômenos físicos que regem uma emulsão com tamanho de gotícula micrométrico ( $>5\mu\text{m}$ ) (Benita e Levy, 1993; Solans *et al.*, 2005; Jumaa e Müller, 1998; Floyd, 1999; Tadros *et al.*, 2004).



A utilização destes sistemas para a administração parenteral de fármacos tem sido amplamente investigada. Gao e colaboradores (2008) prepararam e caracterizaram emulsões lipídicas de uso parenteral com docetaxel (0.4 or 0.8 mg/mL), com a finalidade de obter uma formulação para a redução de toxicidade relacionada a solução micelar disponível comercialmente. Já Wang e colaboradores (2006) comprovam através de seu estudo um prolongamento da liberação de nalbufina e diminuição de atividade hemolítica por utilização de sistema de tensoativo baseado em lecitina e interação com éteres alquilados do polioxietileno.

As principais vantagens estão relacionadas a estabilidade, diminuição de toxicidade de formulações e veiculação de fármacos pouco solúveis em água (Tadros, 2004; Tamilvanan, 2004; Floyd, 1999). O potencial de redução de toxicidade de fármacos pode ser exemplificado pelo estudo de Zhang e colaboradores (2008), onde a veiculação de vinorelbine com utilização de emulsão submicrométrica reduziu significativamente a irritação severa gerada pela utilização de formulação aquosa.

Como o sistema é constituído de duas fases, uma polar e outra apolar, fármacos veiculados em emulsões submicrométricas apresentam uma atividade biológica em grande parte das vezes mais estável, visto que para sofrer tanto metabolismo como degradação deve se difundir da matriz lipídica (Benita e Levy, 1993; Han *et al.*, 2004; Waitzberg, 2006; Cox *et al.*, 1998). Além desta estabilidade na atividade biológica, Yan e colaboradores (2007) relatam que o uso de flunarizina veiculada em emulsões submicrométricas parenterais pode ter sua biodisponibilidade aumentada quando comparada ao fármaco administrado na mesma dose só que em solução.

As emulsões parenterais originalmente foram criadas para suplementação lipídica na nutrição parenteral (Klang e Benita, 1998). De acordo com Waitzberg (2005) e Waitzberg e colaboradores (2006), as emulsões lipídicas utilizadas na nutrição parenteral podem ser classificadas em 3 gerações. A primeira geração é representada pelas emulsões convencionais cuja fase interna era composta basicamente por óleo de soja. A segunda geração é representada por misturas de triglicerídios de cadeia média e longa, esta mudança foi devido ao efeito imunossupressor e inflamatório sistêmico dos óleos ricos em ácido graxos poliinsaturados  $\omega$ -6 (óleo de soja) (Calder, 2009; Calder *et al.*, 1994). A terceira geração é composta por formulações onde o óleo de peixe e outros componentes

como vitamina E foram incluídos como núcleo oleoso. Estas novas composições são ricas em ácido graxos poliinsaturados  $\omega$ -3, exercendo efeitos clinicamente comprovados de imunomodulação e atividade antiinflamatória (Calder, 2006; Wanten *et al.*, 2007). Na tabela 1 verifica-se a composição e outras características de algumas emulsões lipídicas comerciais de uso parenteral.

Tabela 1: Exemplos de emulsões lipídicas para nutrição parenteral

Fabricante	Nome	Tipo de óleo (% por peso)	Razão de Ácidos graxos poliinsaturados n-6 para n-3	% Fosfolipídios	Glicerol (g/L)	pH
Abbott	Liposyn 10 e 20%	Soja (50%), Açafrão (50%)	07:01	1,2	25	8.0
Fresenius- Kabi	Lipovenoes 10 e 20%	Soja	07:01	1,2	25	8
Baxter	Intralipid 10 e 20%	Soja	07:01	1,2	22	8.0
B Braun- LCT/MCT	Lipofundin 10 e 20%	Côco (50%), Soja (50%)	07:01	1,2	25	6.5–8.5
Fresenius- Kabi	Structolipid 20%	Côco (36%), Soja (64%)	07:01	1,2	22.5	8.0
Baxter	ClinOleic 20%	Oliva (80%), Soja (20%)	09:01	1,2	22.5	7.0–8.0
Fresenius- Kabi	Omegaven 10%	Óleo de Peixe	01:08	1,2	25	7.5–8.7
Fresenius- Kabi	SMOFlipid 20%	Soja (30%), Côco (30%), Oliva (25%), Peixe (15%)	2.5:1	1,2	25	8.0
Referências:	Tamilvanan, 2004; Tamilvanan, 2009; Rxlist, 2009; Rowe, 2006; Klang e Benita, 1998; Wanten e Calder, 2007; Strickley, 2004					

Não se restringindo ao aspecto nutricional das emulsões lipídicas, Tamilvanan (2004; Tamilvanan, 2009) executou uma classificação mais ampla, considerando também o desempenho como carreadores de substâncias. Neste caso, a primeira geração contempla todas as formulações de emulsões lipídicas utilizadas na nutrição parenteral. A segunda geração compreende as emulsões lipídicas que conferem estabilização e solubilização de fármacos para liberação controlada ou liberação em sítios específicos.

São formulações onde o componente oleoso perfaz entre 0,5 a 50% da composição, o emulsificante entre 0,1 e 10%, o tensoativo não iônico entre 0,05 a 5% e, por fim, uma quantidade suficiente do componente aquoso. A terceira geração utiliza emulsificantes catiônicos complexos, que associam diferentes tipos de estruturas, tais como fosfolipídios, polioxietilenos e aminas primárias. A função principal desta estratégia de “cationização” é melhorar a captação celular (Tamilvanan, 2004; Tamilvanan 2009). Na tabela 2, são demonstrados alguns fármacos veiculados em nanoemulsões de uso parenteral.

Com relação à estabilidade, os sistemas submicrométricos estão sujeitos aos mesmos fenômenos físicos de instabilidade de emulsões micrométricas, tais como:

- **Floculação:** fenômeno relacionado a uma fraca e reversível interação entre micelas que ainda permanecem separadas pelo filme interfacial (Eccleston, 2007; Benita e Levy, 1993; Solans *et al.*, 2005; Jumaa e Müller, 1998; Floyd, 1999; Tadros *et al.*, 2004).
- **Coalescência:** processo irreversível onde as gotículas da fase oleosa se fundem gerando gotículas maiores. Em condições mais avançadas de instabilidade ocorrerá a separação de fase (Tadros, 2004; Jumaa e Muller, 1999)
- **Cremagem ou sedimentação:** ocorre quando as gotículas ou o floculado se separa pela influência da gravidade formando camadas mais concentradas na superfície (cremagem) ou na parte inferior de um frasco (sedimentação). É possível a reversão por simples agitação (Tadros, 2004; Jumaa e Muller, 1999; Eccleston, 2007).
- **Amadurecimento de Ostwald (Ostwald Ripening):** ocorre devido ao efeito de tensão superficial quando há uma miscibilidade significativa entre fase interna e externa. As pequenas gotículas (<1  $\mu\text{m}$ ) mais solúveis na fase externa que as maiores, tendem ao estado de equilíbrio pela difusão de suas moléculas solubilizadas na direção das gotículas de maior diâmetro. Este fenômeno irreversível com o tempo acarretará em separação de fases devido ao aumento micelar progressivo. (Henry *et al.*, 2010; Meinder e Van Vliet, 2004).

Tabela 2: Fármacos e Emulsões Lipídicas de uso parenteral

Nome (Fabricante)	Fármaco	Dosagem	Composição	Referências
Diazepam-Lipuro (Braun Melsungen)	Diazepam	5 mg/ml	Óleo de soja 15%, Monoglicerídios acetilados 5%, 1,2% de fosfolipídios, 2,25% de glicerol, pH entre 6,0 e 8,5	Klang e Benita, 1998; B.Braun, 2009
Diprivan (Astra Zeneca)	Propofol	10 mg/ml	Óleo de soja 10%, 1,2% de fosfolipídios, 2,25% de glicerol, pH entre 6,0 e 8,5	Rxlist, 2009; Tamilvanan, 2009; Astrazeneca, 2009
Etomidat-Lipuro (Braun Melsungen)	Etomidato	2 mg/ml	Óleo de soja 10%, 1,2% de fosfolipídios, 2,5% de glicerol, pH entre 6,5 e 8,5	Klang e Benita, 1998; B.Braun, 2009
Lipotalon (Merckle)	Dexametasona Palmitato	4 mg/ml	Óleo de soja 10%, 1,2% de fosfolipídios, 2,5% de glicerol, pH entre 6,5 e 8,5	Tamilvanan, 2004; Yokoyama e Watanabe, 1996
Stesolid (Dumex-Alpha)	Diazepam	5 mg/ml	Óleo de soja 10%, pH entre 6,5 e 8,5	Tamilvanan, 2009
Fluad (MF59) (Chiron)	Adjuvante para Vacina Influenza (15 µg de hemaglutininas de influenza virus)	0,5 ml	Esqualeno 5%, 0.8 mg/ml DOTAP, 0.5% de Span 85, 0.5% de polissorbato 80	Tamilvanan, 2009; Ott e colaboradores 2002
Cleviprex (The Medicines Company)	Clevidipina butirato	0.5 mg/mL	Soja 20%, 1,2 de fosfolipídios	Tamilvanan, 2009; Rxlist, 2009
Liple (Mitsubishi-Pharma)	Alprostadil	5 µg/ml	Soja 10%, 1,8 % de fosfolipídios	Klang e Benita, 1998; Mizushima, 1994; Yamaguchi, 1996; Igarashi <i>et al.</i> , 2001.

### 3.3 Formulação de emulsões parenterais

#### 3.3.1 Óleos

A escolha do óleo é uma das primeiras etapas da formulação de emulsões parenterais. As especificações para este tipo de sistema são mais rígidas, possuindo além da pureza, um custo diferenciado, comparativamente às exigidas por outras vias de administração (Benita e Levy, 1993; Floyd, 1999).

Os óleos normalmente selecionados podem ser classificados em dois grupos, os que possuem triglicerídeos de cadeia longa (TCL) derivados do óleo de soja, gergelim, açafraão, algodão, oliva e rícino (Strickley, 2004, Wanten e Calder, 2007), e os triglicerídeos de cadeia média (TCM) derivados da reesterificação dos ácidos graxos fracionados do óleo de côco. Cada óleo, de acordo com a tabela 3, apresenta uma composição diferenciada com relação ao teor de ácidos graxos (Rowe, 2006).

Com relação aos ácidos graxos majoritários, merecem destaque os derivados do TCM e do óleo de rícino. O TCM apresenta características positivas, tanto de solubilização como de metabolismo relacionadas à presença predominante de ácido graxo com 8 carbonos em sua composição (Tamilvanan, 2004; Bach e Babayan, 1982). No óleo de rícino, ressalta-se a hidroxila do ácido ricinoléico, este grupamento possui elevada reatividade ao mesmo tempo em que favorece a estabilidade do óleo, reduzindo a produção de peróxidos. Além disso, elas aumentam a viscosidade devido à formação das pontes de hidrogênio (Ogunniyi, 2006).

É importante ressaltar a estrutura química dos ácidos graxos majoritários de cada óleo, conforme demonstrado nas figuras 2 a 6.

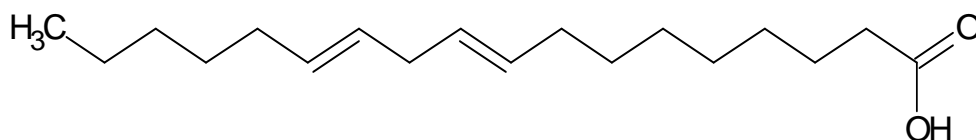


Fig. 2. Ácido linoléico- Óleo de soja, gergelim e algodão

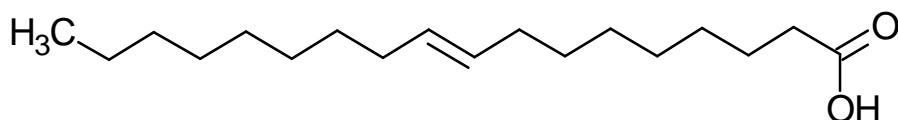


Fig. 3. Ácido oléico- Óleo de gergelim, açafrão, algodão e oliva

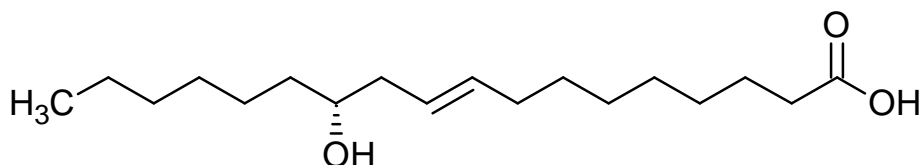


Fig. 4. Ácido ricinoléico- Óleo de rícino

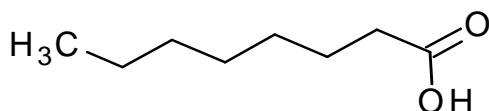


Fig. 5. Ácido cáprico- Triglicerídeos de Cadeia média

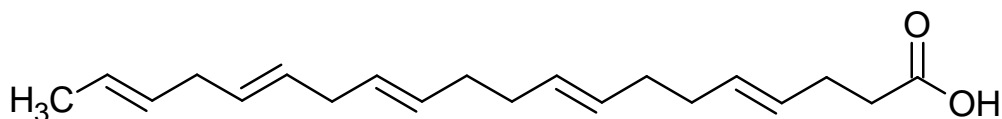


Fig. 6. Ácido eicosapentaenóico- Óleo de peixe

Uma das funções das emulsões submicrométricas é a incorporação de fármacos pouco hidrossolúveis. O núcleo oleoso possui na maioria das vezes uma função indispensável para incorporação destes, uma escolha inequívoca envolve a avaliação de sua capacidade de solubilização e cada óleo possui uma característica específica, tais como polaridade, viscosidade e estabilidade, tendo desempenhos diferentes na maioria das vezes. O conjunto destes resultados, tanto de solubilização, disponibilidade para administração parenteral, facilidade de manuseio e estabilidade, levam a escolha do óleo ou misturas que serão utilizados no sistema (Benita e Levy, 1993; Tadros, 2004; Constantinides, 2008; Klang e Benita, 1998, Floyd, 1999, Yu e colaboradores, 1993).

Tabela 3: Composição dos óleos em ácidos graxos

Tipo de óleo	Ácidos graxos (Abreviatura) (%)											Referências					
	Capróico (C 6:0)	Caprílico (C 8:0)	Capríco (C 10:0)	Láurico (C 12:0)	Araquídico ou Eicosanoico (C 20:0)	Mirístico (C 14:0)	Palmitico (C 16:0)	Palmitoleico (C 16:1(n-7))	Estearico (C 18:0)	Ricinoleico (C 18:1(-OH))	Oléico (C 18:1(n-9))		Linoléico (C 18:2(n-6))	Linolênico (γ C 18:3(n-6); α C 18:3(n-3))	Eicosapentaenoico (C 20:5(n-3))	Docosapentaenoico (C 22:5(n-3))	Docosahexaenoico (C 22:6(n-3))
Soja	-	-	-	-	-	-	9-13	-	3-6	-	17-26	50-57	5-10	-	-	-	Rowe, 2006; Wanten, 2007
Gergelim	-	-	-	-	0.8	-	9.1	-	4.3	-	45.4	40.4	-	-	-	-	Rowe, 2006; Beare-Rogers e Dieffenbacher, 2001
Açafrão (↑Linoléico)	-	-	-	-	-	-	4.8	-	1.3	-	75.3	14.2	-	-	-	-	Beare-Rogers e Dieffenbacher, 2001
Açafrão (↑Oléico)	-	-	-	-	-	0.1	6.2	0.4	2.2	11.7	74.1	0.4	-	-	-	-	Beare-Rogers e Dieffenbacher, 2001
Algodão	-	-	-	-	0.6	0.3	19.1	-	1.9	-	33.1	39.3	-	-	-	-	Beare-Rogers e Dieffenbacher, 2001; Rowe, 2006
Oliva	-	-	-	-	-	-	7.5-20.0	0.3-5.0%	0.5-5.0	-	55.0-83.0	3.5-21.0	≤0.9	-	-	-	Beare-Rogers e Dieffenbacher, 2001; Rowe, 2006
Rícino	-	-	-	-	-	-	2	-	1	87	7	3	-	-	-	-	Rowe, 2006; Watanabe <i>et al.</i> , 1999
TCM	1 a 2	65 a 75	25 a 35	1 a 2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Bach e Babayan, 1982
Peixe	-	-	-	-	-	6-9	15-20	9-14%	3-4	-	5-12	<3	<3	10-15	1 a 3	8-15	Jalali-Heravi e Vosough, 2004; Frankel <i>et al.</i> , 2002

### 3.3.2 Emulsificantes ou tensoativos

Entre os emulsificantes de uso parenteral, as lecitinas, tanto de origem animal como vegetal, são as mais comumente utilizadas. São tensoativos anfóteros ou zwitteriônicos, apresentam cabeça polar anfotérica, sendo que a carga desta pode mudar com a variação de pH. Em pH ácido terá comportamento catiônico e em pH básico, aniônico (Leal-Calderón, 2007).

Dependendo da natureza apresentam grandes diferenças na composição e, por conseguinte, em suas propriedades físico-químicas. A lecitina de soja, por exemplo, com relação a seu teor de fosfatidilcolina, apresenta uma quantidade três vezes menor que a lecitina de ovo (Rowe, 2006, Scholfield, 1981; Dornbos *et al.*, 1989; Palacios e Wang, 2005; Yu *et al.*, 1993, Tadros *et al* 2004, Bouchemal *et al.*, 2004).

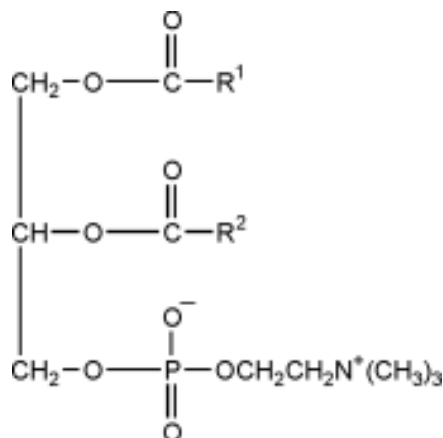
É importante ressaltar que a lecitina de ovo possui uma maior proporção de ácidos graxos saturados em relação a de soja, sugerindo uma melhor estabilidade em relação a oxidação. Em contrapartida, a lecitina de soja tem apresentado melhor estabilidade em emulsões óleo em água (Palacios e Wang, 2005). Na tabela 4, demonstram-se as composições típicas das diferentes lecitinas.

Outra consideração importante é o grau de purificação das lecitinas, subdividindo-as em grau natural e refinado. A consistência pode variar entre plástica a fluida, dependendo dos ácidos graxos livres, conteúdo de óleo, e também da presença de outros diluentes. A cor pode oscilar entre amarelo claro a marrom, dependendo da fonte de obtenção. Pode ser inodora ou com odor característico (noz). É parcialmente solúvel em água, mas se hidrata rapidamente formando emulsão. A fração de fosfatídeos livres é solúvel em ácidos graxos, mas praticamente insolúvel em óleos fixos. Na presença de todas as frações de fosfatídeos, a lecitina é parcialmente solúvel em álcool e praticamente insolúvel em acetona (USP, 2007; Rowe, 2006).



Tabela 4: Propriedades típicas das lecitinas

Tipo de lecitina	Composição	% permitido para uso parenteral	Incompatibilidades	Referências
Lecitina de ovo	Fosfatidilcolina 69% Fosfatidiletanolamina 24% Fosfatidilserina 3% Esfingomielina 1%	1,20%	Esterases que promovem hidrólise de ésteres	Rowe, 2006; FDA, 2009; Marti-Mestres e Nielloud, 2000;
Lecitina de soja	Fosfatidilcolina 19-21% Fosfatidiletanolamina 8-20% Inositol fosfatídeos 20-21% Outros fosfatídeos 5-11% Óleo de soja 33-35% Esteróis 2-5% Carboidratos livres 5% Umidade 1%	11,25%	Esterases que promovem hidrólise de ésteres	SCHOLFIELD, 1981; Rowe, 2006; FDA, 2009.
Lecitina de milho	Fosfatidilcolina 31% Fosfatidiletanolamina 3% Inositol fosfatídeos 16% Ácido fosfatídico 9% Óleo de soja 33-35% Fosfatidilserina 1%	Não mencionado	Esterases que promovem hidrólise de ésteres	Marti-Mestres e Nielloud, 2000.
Lecitina de girassol	Fosfatidilcolina 14% Fosfatidiletanolamina 24% Fosfatidilinositol 13% Fosfatidilserina 1%	Não mencionado	Esterases que promovem hidrólise de ésteres	Marti-Mestres e Nielloud, 2000.



**R<sup>1</sup> e R<sup>2</sup> são ácidos graxos, que podem ser idênticos ou diferentes**

Fig. 7. Fórmula estrutural da alfa-fosfatidilcolina (lecitina natural)

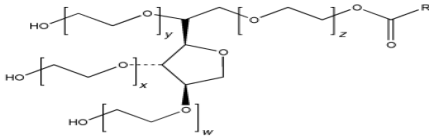
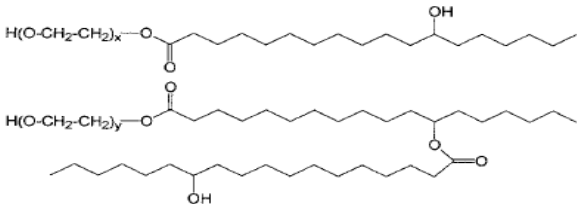
Existe a forma  $\beta$ , que diferencia-se da  $\alpha$  pela troca de posição entre R<sup>2</sup> e grupo contendo fósforo (Rowe *et al.*, 2006).

As lecitinas naturais são comercializadas de acordo com grau de pureza e fonte. Os catálogos dos fabricantes mundiais oferecem lecitinas purificadas tanto de ovo como de soja com teores aproximados de 80% de fosfatidilcolina, fosfolipídios naturais purificados, cuja constituição é praticamente 100% de fosfatidilcolina, e também lecitinas e fosfolipídios hidrogenados (ICH, 2005; Lipoid, 2009; Avanti Polar Lipids, 2009).

Outros tensoativos muito utilizados são os sintéticos não-iônicos. Possuem estrutura semelhante aos tensoativos com carga, mas sua cabeça polar é constituída de cadeias de polióxido de etileno. Ao contrário dos tensoativos carregados, possuem pouca sensibilidade à adição salina, mas são muito instáveis frente à temperatura (Malmsten, 2002).

Este grupo de tensoativos pode ser utilizado concomitantemente às lecitinas para favorecer a estabilidade dos sistemas formando complexo emulsificante (Malmsten, 2002). Os principais tensoativos aprovados para uso parenteral são demonstrados na tabela 5.

Tabela 5: Principais tensoativos não-iônicos permitidos para uso parenteral

Nome (CAS)	Estrutura química e Características	Referências
Polissorbato 80 ou Monooleato de sorbitano polietoxilado (9005-65-6)	 <p>Líquido oleoso amarelado, com odor característico e sabor amargo. Sofre clivagem dos grupamentos óxido de etileno por auto-oxidação e hidrólise do grupamento éster do ácido graxo. Percentual permitido para uso parenteral: 12%.</p>	Rowe, 2006 ; FDA, 2009; Strickley, 2004 ;USP, 2007; Kerwin, 2008
Óleo de rícino etoxilado (61788-85-0)	$\begin{array}{c} \text{H}_2\text{C}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_x\text{OCO}(\text{CH}_2)_7\text{CH}=\text{CHCH}_2\text{CHOH}(\text{CH}_2)_5\text{CH}_3 \\   \\ \text{HC}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_y\text{OCO}(\text{CH}_2)_7\text{CH}=\text{CHCH}_2\text{CHOH}(\text{CH}_2)_5\text{CH}_3 \\   \\ \text{H}_2\text{C}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_z\text{OCO}(\text{CH}_2)_7\text{CH}=\text{CHCH}_2\text{CHOH}(\text{CH}_2)_5\text{CH}_3 \end{array}$ $(x + y + z - 35)$ <p>Líquido viscoso amarelado, límpido a 25°C. É caracterizado por mistura onde 83% dos componentes possuem um comportamento hidrofóbico (polietilenoglicol ricinoleato de glicerol) e 17% hidrofílico (polietilenoglicol e glicerol etoxilado). Percentual permitido para uso parenteral: 65%.</p>	Strickley, 2004; Rowe, 2006; Floyd, 1999; He <i>et al.</i> , 2003; Gelderblom <i>et al.</i> , 2001; Chao <i>et al.</i> , 2005
Diésterato de Polioxietileno (solutol HS15, CAS: 9005-08-7)	 <p>Consiste de 70% de porção lipofílica constituídas de mono e diésteres de ácido 12-hidroxiesteárico e o restante de polietilenoglicol. A molécula é obtida por um processo sintético através da reação de ácido hidroxiesterárico com óxido de etileno. A temperatura ambiente é uma cera branca amarelada fundindo em aproximadamente 30°C. Percentual permitido para uso parenteral: 50%.</p>	Strickley, 2004; Rowe, 2006
Poloxamer 188 (CAS: 106392-12-5)	$\text{HO}-(\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{O})_x-(\text{CH}_2-\overset{\text{CH}_3}{\text{C}}-\text{O})_y-(\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{O})_x-\text{H}$ <p>Copolimero de polioxietileno-polioxipropileno, sendo polioxietileno a fração hidrofílica e o polioxipropileno a fração lipofílica. Consiste de grânulos cerosos brancos, praticamente inodoros e insípidos. Apresentam um ponto de fusão que varia entre 57°C. Estudos demonstram que este tensoativo atua na hipersensibilização de receptores em células malignas resistentes favorecendo a citotoxicidade de fármacos antitumorais. Percentual permitido para uso parenteral: 0,6%.</p>	Moghimi <i>et al.</i> , 2004; Rowe, 2006; Jumaa e Muller, 1998; Batrakova <i>et al.</i> , 1999; Kabanov <i>et al.</i> , 2002; Wang <i>et al.</i> , 2007.

### 3.3.3 Outros componentes

As emulsões parenterais geralmente possuem isotonicidade situada entre 250 e 400 mOsm Kg<sup>-1</sup>. Como os componentes da fase externa não contribuem para esse ajuste, geralmente se adiciona uma quantidade equivalente a 2,0 ou 2,5% de glicerina para alcançar a isotonicidade especificada (Floyd, 1999; Klang e Benita, 1998; Wanten e Calder, 2007)

Os ácidos graxos poliinsaturados, presentes nos óleos de soja e nos demais óleos ricos em triglicerídeos de cadeia longa (Beare-Rogers e colaboradores 2001), que são utilizados nas composições das emulsões parenterais lipídicas, possuem tendência a peroxidação lipídica (Dupont, 1999). A presença destes peróxidos pode ser fatal para neonatos, além de causar danos ao sistema imunológico de pacientes adultos (Sweeney *et al.*, 2005; Pitkanen, 1992).

A diminuição do risco de formação de peróxidos pode ser realizada mediante utilização de antioxidantes. Pela via intravenosa podem ser usados o alfa tocoferol, o ácido ascórbico (com restrições devido a degradação interfacial das emulsões baseadas em fosfatidilcolina), ascorbato de sódio e desferrioxamina (Nikas e colaboradores, 2008; Rowe, 2006, Floyd, 1999, Hammad e Müller, 1998; Strickley, 2004; Klang e Benita, 1998; FDA, 2009).

O pH constitui um importante fator para a estabilidade de uma emulsão, principalmente as constituídas por lecitina, pois seus grupamentos anfóteros apresentam o melhor desempenho em uma faixa relativamente estreita de pH, entre 5,0 e 8,0. Durante o processo de manipulação, o ajuste e a manutenção desta faixa de pH é preferencialmente feita com hidróxido de sódio e ácido clorídrico diluídos. Já a utilização de tampões pode prejudicar o sistema emulsionado, pois estes podem catalisar os fenômenos de instabilidade devido à alteração do potencial elétrico do meio (Strickley, 2004; Klang e Benita, 1998; FDA, 2009; Yu e colaboradores, 1993)

## 3.4 Métodos de preparação de emulsões submicrométricas

A produção de nanoemulsões pode ser realizada por diferentes métodos, e entre os mais citados estão: a homogeneização à alta pressão, microfluidização, ultra-

sonicação, emulsificação espontânea e método da temperatura de inversão de fases ou método PIT (Tadros *et al.*, 2004; Robin *et al.*, 1993; Yilmaz e Borchert, 2005; Bouchemal *et al.*, 2004; Forgiarini *et al.*, 2001; Sadurní *et al.*, 2005; Manson *et al.*, 2006; Almeida *et al.*, 2008).

Importante salientar que nos processos de homogeneização à alta pressão, microfluidização e ultrasonicação, a formação de emulsões com gotículas nanodimensionadas ou submicrométricas passa primeiro pela obtenção de uma emulsão grosseira ou micrométrica, ou seja, o processo é realizado em duas etapas. A etapa prévia geralmente utiliza homogeneizadores (por exemplo, Ultraturrax®) que junto ao calor empregam uma alta taxa de cisalhamento ao sistema formando uma emulsão com gotículas com diâmetro em torno de 1 a 10 micrômetros (Benita e Levy, 1992; Almeida *et al.*, 2008; Flourey *et al.*, 2004). Subsequentemente são empregados ultrahomogeneizadores, microfluidizadores ou ultrasonicadores que através de diferentes mecanismos como alta pressão, microcanais e ultrassom levam à redução do tamanho de gotícula à escala nanométrica (Benita e Levy, 1992; Almeida *et al.*, 2008; Flourey *et al.*, 2004; Mason *et al.*, 2006b; Pinnamaneni *et al.*, 2003; Mason *et al.*, 2006a; Gaikwad e Pandit, 2008).

Existem ainda os processos de emulsificação de baixa energia, entre estes, o método de temperatura de inversão de fases (PIT- Phase Inverse Temperature) e o método de emulsificação espontânea (Bouchemal *et al.*, 2004; Yu *et al.*, 1993). Uma revisão atual sobre todos estes métodos é apresentada por Almeida e colaboradores (2008).

O processo de emulsificação espontânea, empregado no presente trabalho, consiste na mistura de uma fase orgânica homogênea composta por óleo, tensoativo lipofílico e solvente miscível em água, e uma fase aquosa que contém tensoativo hidrofílico e água. Este procedimento de mistura se dá pela adição por injeção lenta da fase orgânica sobre a fase aquosa, que está sob agitação. Instantaneamente, é formada uma emulsão óleo/água pela difusão do solvente orgânico pela fase externa aquosa, formando as gotículas com tamanho nanométrico (Bouchemal *et al.*, 2004). Todo o solvente orgânico miscível em água é removido por evaporação à pressão reduzida (Yu *et al.*, 1993; Bouchemal *et al.*, 2004; Benita e Levy, 1993; Tadros, 2004).

Embora este processo de emulsificação tenha sido relatado pela primeira vez em 1878, o fenômeno ainda continua não completamente elucidado (Malmsten, 2002). O processo é produzido por diferentes mecanismos que são afetados pela composição do sistema e suas propriedades físico-químicas (Lopes-Montilla *et al.*, 2002). Entre esses mecanismos citam-se: turbulência interfacial, tensão interfacial negativa e difusão.

A turbulência interfacial é devida ao gradiente de tensão interfacial gerado pela distribuição não uniforme das moléculas do surfactante na interface, o que acaba gerando instabilidade mecânica, possibilitando a formação de gotículas (Leal-Calderon, 2007).

A tensão interfacial negativa é o fenômeno ocorrido devido à alta concentração de tensoativo na interface, diminuindo de forma muito acentuada a tensão. Como o processo é dinâmico, a interface óleo/água aumenta e qualquer força atuante acaba reestruturando o sistema (Eccleston, 2007; Leal-Calderon, 2007).

A difusão é um dos mecanismos que mais explicam a formação de micelas nanoestruturadas. Quando o solvente com a fase oleosa difunde-se pela fase aquosa, acaba carreando pequenas quantidades de óleo e formando gotículas à medida que o meio aquoso fica saturado de óleo (Eccleston, 2007; Leal-Calderon, 2007).

### **3.5 Caracterização e controle de qualidade de emulsões submicrométricas**

#### **3.5.1 Diâmetro de gotícula**

Este parâmetro é dos mais importantes quando se trata de um sistema de administração intravenosa. Esta via se restringe a tamanhos de gotículas menores que 1  $\mu\text{m}$ , preferencialmente entre 100 e 500 nm (Floyd, 1999, Klang e Benita, 1998). Especificamente, emulsões parenterais submicrônicas ou nanodimensionadas apresentam diâmetro de partícula entre 50 e 1000 nm (Tadros 2004; Levy e Benita, 1992; Tamilvanan, 2009, USP, 2008). O cuidado referente a tamanho de gotícula é relacionado à possibilidade de embolia pulmonar.

O monitoramento do tamanho das gotículas de um sistema disperso também serve como parâmetro para a avaliação da estabilidade de uma formulação. Alterações

deste parâmetro ao longo do tempo podem indicar fenômenos de agregação, como floculação e coalescência (Klang e Benita, 1998).

Para a determinação desta característica na faixa submicrométrica, se dispõe basicamente de 2 métodos. O primeiro é baseado no princípio da zona sensora de passagem elétrica (Princípio de Coulter), e consiste em um sistema de detecção e processamento que realiza a contagem e a medição do tamanho de partícula, em conjunto com um sistema hidrodinâmico. Mede com precisão o volume de solução que passou por uma fenda calibrada, informando a concentração de partículas na dispersão analisada (Lieberman *et al.*, 2005; Shekunov *et al.*, 2007).

O outro método é baseado no espalhamento de luz dinâmica (DLS), conhecido também por Espectroscopia de correlação de Fótons (PCS- Photon correlation spectroscopy) ou Espalhamento de Luz Quasi-elástico (Haskell, 1998). Consiste na passagem de feixe de laser através do líquido contendo partículas em movimento browniano. O espalhamento de luz resulta em flutuações na intensidade do feixe, a intensidade destas flutuações é dada pelo ângulo de espalhamento, e são usadas para inferir o tamanho de partícula ou o diâmetro hidrodinâmico das partículas suspensas (Shekunov *et al.*, 2007; Merisko-Liversidge *et al.*, 2003; Müller *et al.*, 2001).

Outro parâmetro que pode ser calculado com relação ao diâmetro de gotícula é o índice de polidispersidade. Através desta medida de variância relativa conclui-se sobre o desvio padrão de uma hipotética distribuição gaussiana das partículas do sistema (Malvern, 2008).

### 3.5.2 Potencial zeta

É a quantificação das forças eletrostáticas que regem um sistema emulsionado. É o potencial no plano de cisalhamento hidrodinâmico (Rossi e Leroux, 2007).

O potencial total de interação entre duas gotículas é corresponde à diferença entre as forças atrativas de van der Waal's e forças repulsivas eletrostáticas. Uma emulsão atinge um máximo de estabilidade quando o potencial zeta é maior em módulo que 30 mV (Rossi e Leroux, 2007, Floyd, 1999).

Outro fator importante é relacionado à extensão de ionização pH dependente dos tensoativos baseados em fosfolípidios, sendo que estas constantes de ionização são intrinsicamente ligadas à composição fosfolípida destes tensoativos (Klang e Benita, 1998; Rossi e Leroux, 2007)

A obtenção do potencial zeta numa nanoemulsão pode ser realizada através de técnicas eletroforéticas ou de equipamentos que aplicam um campo elétrico na dispersão coloidal. As partículas carregadas tenderão a migrar para o eletrodo de carga oposta com velocidade proporcional ao potencial (Benita e Levy, 1992, Klang e Benita, 1998).

### 3.5.3 Avaliação físico-química do sistema nanoemulsionado

Além dos testes já mencionados, existem outros parâmetros de avaliação da integridade do sistema. Entre eles, teor do fármaco e presença de produtos de degradação, pH, viscosidade, testes de esterilidade, pirogenicidade, eficiência de encapsulamento e ensaios de liberação (Floyd, 1999; Benita e Levy, 1993).



***CAPÍTULO II:***

**VALIDAÇÃO DE METODOLOGIA ANALÍTICA PARA DOSEAMENTO DE  
NANOEMULSÕES PARENTERAIS CONTENDO TALIDOMIDA**

---



## Determination of thalidomide in parenteral nanoemulsions: development and validation of an HPLC method

F. A. Araújo, R. B. Finatto, K. Ferronato, L. K. Oliveira, R. G. Kelmann, H. F. Teixeira, L. S. Koester\*

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

\*Corresponding author, Tel.: +55 5133085231; FAX: +555133085437.

E-mail address: [leticiaakoester@gmx.net](mailto:leticiaakoester@gmx.net) (L.S. Koester)



## ABSTRACT

Thalidomide is a glutamic acid derived racemic compound. Due to its low aqueous solubility and stability, there is no parenteral formulation commercially available up to now, which would be desirable in cases such as coma, swallowing problems, low absorption or sepsis. The purpose of the present work was to develop and validate an HPLC method in order to determine thalidomide content in intravenous nanoemulsions. The method was carried out on a chromatographic system using a RP-18 column with a mobile phase composed of acetonitrile: ammonium acetate buffer (pH 5.5; 10 mM) (45:55, v/v), flow rate of 1mL/min and detection at 300 nm. The following parameters were evaluated: linearity, specificity, precision, accuracy, robustness and system suitability. The linearity in the range of 1.0-6.0 µg/mL presented a determination coefficient ( $r^2$ ) of 0.999, calculated by least squares regression; the R.S.D. values for intra-day and inter-day precision were <0.81 and <1.33%, respectively. The recovery of thalidomide from the sample matrices ranged from 99.6% to 100.9%. The LOD and LOQ were 0.057 and 0.172 µg/mL, respectively.

Keywords: Thalidomide; HPLC; submicron emulsion; parenteral ; validation; nanoemulsion



## 1. Introduction

Thalidomide (THD) [*1H*-Isoindole-1,3(*2H*)-dione, 2-(2,6-dioxo-3-piperidiny)-, (±)-(±)-*N*-(2,6-Dioxo-3-piperidyl)phthalimide;  $\alpha$ -(*N*-Phthalimido)glutarimide; C<sub>13</sub>H<sub>10</sub>N<sub>2</sub>O<sub>4</sub>], is a glutamic acid derived racemic compound. The glutarimide moiety contains the single asymmetric center and exists in two optically active forms designated S-(-) or R-(+). Thalidomide consists of an equimolar amounts of enantiomers (+)-(R)-and (-)-(S)-thalidomide [1].

In 1998, thalidomide was approved by the U.S. Food and Drug Administration (FDA) for the management of acute cutaneous manifestations of ENL (erythema nodosum leprosum) or prevention of its recurrences (type II) and most recently was approved for the treatment of multiple myeloma. No parenteral formulation is commercially available, which would be desirable in cases such as coma, swallowing problems, low absorption or sepsis [2-5].

Due to its poor solubility in aqueous medium, a nanoemulsion formulation is proposed as a parenteral delivery system for thalidomide. The emulsions were prepared by spontaneous emulsification, and according to this procedure, a fraction of the organic phase (ethanol and oil core) is injected into the aqueous phase under magnetic stirring. After, the mixture is subjected to the evaporation under reduced pressure until the final thalidomide concentration of 0.1 mg / ml (w/v) [6-7].

A literature survey reveals the absence of analytical methods for thalidomide assay in colloidal systems. In fact, a small number of HPLC methods have been described for the quantitation of thalidomide in other delivery systems, like cyclodextrins and nanoparticles [4, 8-9]. Thus, the purpose of the present study was to develop and validate an HPLC method for thalidomide determination in nanoemulsion formulation.

## 2. Experimental

### 2.1. Chemicals and reagents

Thalidomide reference standard (RS) (99%) and raw material (Microbiologica) were kindly gifted by Fundação Ezequiel Dias (Minas Gerais, Brazil). Ultrapure water was obtained from a Milli-Q® Plus apparatus (Millipore, Billerica, USA). HPLC grade acetonitrile and methanol were purchased from CER Brasil (São Paulo, Brazil) and Tedia (Rio de Janeiro, Brazil), respectively. The excipients used in the preparation of the emulsions were: soybean lecithin (Lipoid S75®), kindly gifted by Lipoid GmbH (Ludwigshafen, Germany); purified castor oil, purchased from Sigma

Aldrich (Seelze, Germany), and polysorbate 80, kindly donated by Croda (Campinas, Brazil). All other chemicals and reagents were of analytical or HPLC grade as appropriate.

The formulation prepared was composed by castor oil, polysorbate 80 and soybean lecithin. The final composition of the emulsion (% w/v) was made up of oil 10, soybean lecithin 3, polysorbate 80 4, glycerol 2.5, and distilled water up to 100. Formulations were prepared with and without thalidomide (0.1 mg/mL, w/v).

### *2.2. Apparatus and chromatographic conditions*

Analyses were performed with an HPLC system Prominence which consisted of a DGU-20A5 degasser, LC-20 AT pumps, a SIL-20 A autosampler, a SPD-20AV UV/Vis detector and a CBM-20A communication bus module. Peak purity analysis was carried out using a SPD-M20A Photodiode Array Detector. The chromatographic data were analyzed using LC solution software, version 1.24 SP1 (Schimadzu, corporation).

The separations were achieved on an analytical chromatographic column (Shimadzu® LC Shim-pack CLC-ODS (M) 4,6 mm x 25 cm (250 x 4,6 mm d.i.)) at room temperature, under a isocratic flow rate of 1.0 mL/min. The UV detector was set at 300 nm. An injection volume of 20 µL was used in these analyses. Appropriate separation of thalidomide and internal standard Phenacetin was performed using a mixture of acetonitrile: ammonium acetate buffer (pH 5.5; 10 mM) (45:55, v/v) as mobile phase.

### *2.3. Standard solutions*

All samples were prepared using a diluent solution composed of acetonitrile: ammonium acetate buffer (pH 5.5; 10 mM) (90:10, v/v). The stock solutions of thalidomide were prepared in volumetric flasks as described: ST1- 20.0 mg of thalidomide in 100 mL of diluent solution, resulting in a 0.200 mg/mL solution; ST2 - 5 mL of ST1 diluted in 50 ml of diluent solution, resulting in a 0.020 mg/mL solution. ST2 was afterward diluted and filtered (membrane Durapore Millex ® 0.45 µm) as needed to prepare six different standard solutions from 1 to 6 µg/mL of thalidomide.

### *2.4. Sample preparation*

The formulations were assayed using the conditions described previously. A 0.300 g of THD nanoemulsion was diluted in the diluent solution into 10 ml volumetric flasks, obtaining 3.0 µg/mL



THD solution, which was filtered through a 0.45 mm membrane and injected into the HPLC system.

### *2.5. Method validation*

The analytical method validation was made based on the ICH Harmonized Tripartite Guideline, Q2(R1) [10]. The method was validated for the parameters: specificity, linearity, limit of detection (LOD), limit of quantitation (LOQ), robustness, precision and accuracy. System suitability parameters were also calculated.

The specificity was evaluated for the presence of interference or overlaps with the thalidomide response by analyzing solutions containing the excipients employed on the preparation of thalidomide nanoemulsion and degradation profile in acid or alkaline medium. In order to obtain these profiles, solutions of 20 µg/mL thalidomide were prepared in volumetric flasks using hydrochloric acid or sodium hydroxide 1 M. Aliquots were withdrawn in predetermined times and neutralized appropriately to be injected in the HPLC (5 µg/mL thalidomide).

The linearity was assessed by injecting six thalidomide standard solutions in the concentration range of 1-6 µg/mL, in three replicates each on three different days. A calibration curve was constructed and the proposed method was evaluated by linear regression. Characteristic parameters for regression equation ( $y = ax + b$ ) were obtained by least-squares method.

The detection and quantitation limits were calculated based on the standard deviation of the response and the slope, using the calibration curve data.

The intra-day precision (repeatability) was evaluated by assaying six nanoemulsion samples at a thalidomide concentration of 3.0 µg/mL, during the same day and under the same experimental conditions. Inter-day precision was evaluated by assaying these samples on 3 different days. The % R.S.D was calculated.

Accuracy study was determined by comparing the theoretical concentrations of thalidomide RS added to blank nanoemulsions (placebo) to those obtained with the chromatographic analysis. Replicates of known amounts of thalidomide, at 3 different levels (lower, medium and upper concentration) corresponding to 2.0 µg/mL, 3.0 µg/mL and 4.0 µg/mL, were spiked in the 0.3 g of placebo. Samples were then diluted, filtered and analyzed.

The stability of analytical solutions was also determined. Standard analytical solutions were analyzed immediately after their preparation as well as 7 days later. The solutions were kept at room temperature.

The robustness was evaluated according to the Plackett-Burman experimental design to seven factors (pH, acetonitrile content, wavelength and four dummies), leading to a total of eight experiments (Table 1). The parameter evaluated in this experimental design was the thalidomide content in the tested samples and statistical analysis was performed by t-student test [11-13]. For each experiment, 20  $\mu\text{L}$  of thalidomide standard solution and formulation, with a theoretical concentration of 5  $\mu\text{g/mL}$ , were injected separately.

System suitability was verified during validation by analyzing theoretical plates, retention factor, asymmetry, resolution and system repeatability (by analyzing the area of thalidomide peak, RSD of six injections thalidomide (5  $\mu\text{g/ml}$ ), demonstrating the injection repeatability) [14-15].

Table 1

Plackett-Burman experimental design and results relative to the percentage of Thalidomide to check the robustness of the analytical method by HPLC

Experiment	pH	Dummy	Dummy	ACN (%)	Dummy	Detector ( $\lambda$ )	Dummy	Thalidomide (%)
1	5,7	+	+	44	+	299	-	98.61
2	5,3	+	+	46	-	301	-	97.37
3	5,3	-	+	46	+	299	+	99.45
4	5,7	-	-	46	+	301	-	97.37
5	5,3	+	-	44	+	301	+	98.36
6	5,7	-	+	44	-	301	+	102.99
7	5,7	+	-	46	-	299	+	99.66
8	5,3	-	-	44	-	299	-	100.01

### 3. Results and discussion

A reversed phase HPLC method was proposed as a suitable method for quantitative determination of thalidomide in nanoemulsions. The chromatographic conditions were adjusted in order to obtain efficient routine analysis. In the PDA, no peak impurity was detected in the proposed wavelength (300 nm), and the peak purity index was 1.0000.

The method previously described in the United States Pharmacopeia (2006) (Water:Acetonitrile:Phosphoric acid, 85:15:0.1) was not suitable to perform the correct chromatographic separation. The matrix complexity and the hydrophobicity of the internal phase of the formulations required a new method for analysis of thalidomide. Therefore, a method with higher proportion of organic phase and with a buffer system to maintain the stability of baseline and retention time was shown necessary (acetonitrile: ammonium acetate buffer (pH 5.5; 10 mM) (45:55, v/v)) [14- 15].

The chromatograms in the Fig. 1 show that there is no interference from the tested excipients, which are also not detected by UV. Fig. 2 represents the stability of thalidomide in the acid medium (1M), and as one can see, the degradation is irrelevant. On the other hand, Fig. 3 demonstrated a very fast degradation of thalidomide in the alkaline medium. The figures show no interference peaks in the retention time of thalidomide. Under these conditions, thalidomide eluted at 4.43 and phenacetin at 5.05 (internal standard).

The method demonstrated to be linear in the 1.0–6.0  $\mu\text{g/mL}$  range and the calibration equation  $y = 10.7057x + 0.2174$  showed excellent correlation coefficient ( $r^2 = 0.9998$ ), highly significant for the method ( $n=18$ ;  $p \leq 0.05$ ). The confidence intervals for the intercept included zero ( $-0.05715$ ;  $+0.491918$ ). Therefore, the result confirms the absence of constant systematic error. Moreover, the analysis of residuals (data not shown) revealed no specific pattern, indicating a normal distribution.

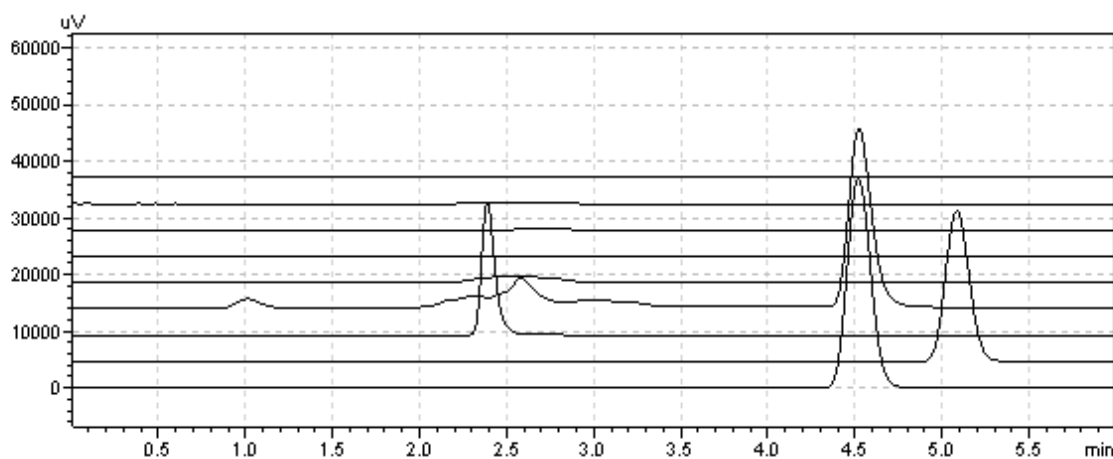


Fig. 1. Chromatograms with base shifted samples (organized from top to bottom) at 300 nm: Castor oil, Soy Lecithin, Glycerol, Polissorbate 80, Blank Nanoemulsion, THD Nanoemulsion, Phtalic Acid, Phenacetin and Thalidomide

The detection and quantitation limits calculated with the ICH equations considering the standard deviation of slope and media of intercept were 0.057  $\mu\text{g/mL}$  and 0.172  $\mu\text{g/mL}$ , respectively.

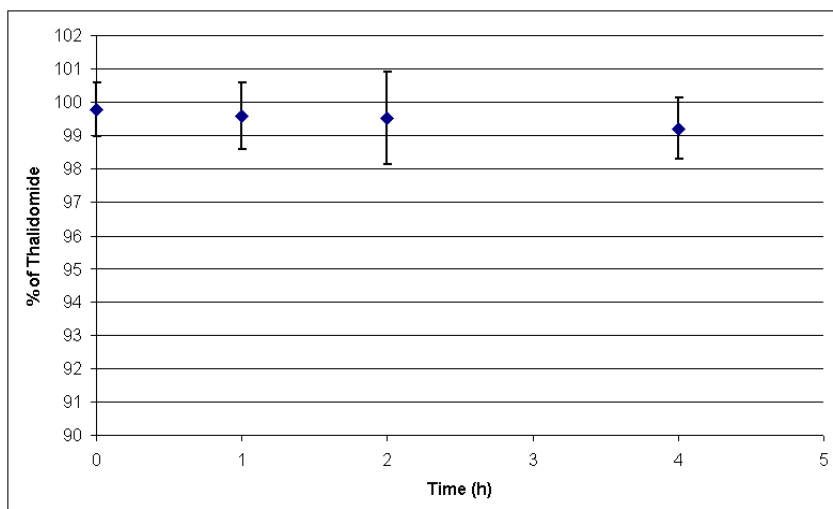


Fig. 2. Degradation profile of thalidomide in acid medium

The precision of the method was assessed considering repeatability (intra-day analysis) and intermediate precision (inter-day analysis). Experimental values and relative standard deviation (RSD) of three-day analysis, for the quantitative determination of thalidomide in the nanoemulsion, was 97.45 %, 99.38 % and 99.97 % and 0.43 %, 0.59 % and 0.81 %, respectively. The RSD for interday results was 1.33 %.

Table 2 shows average percentages of recovery in the range of 99.6% to 100.9%, demonstrating the accuracy of the proposed method.

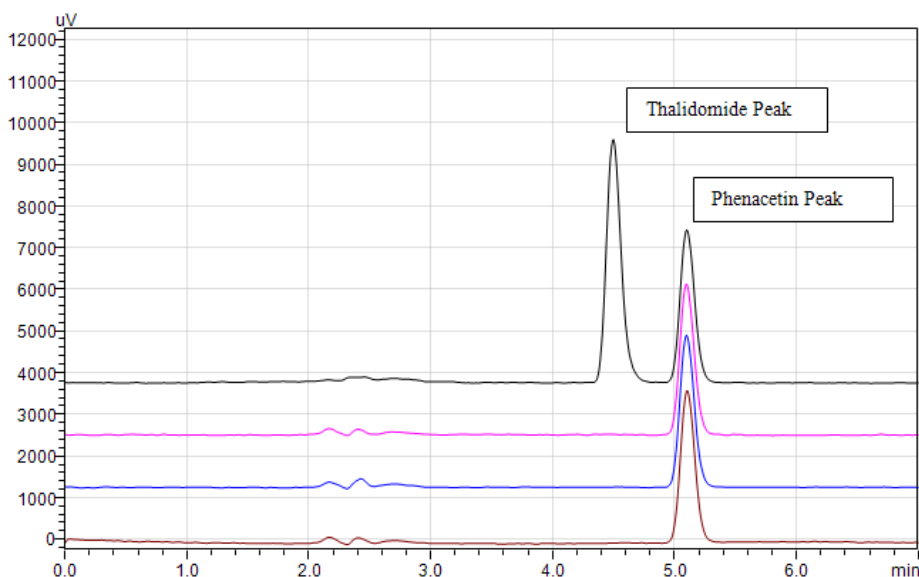


Fig. 3. Chromatograms of the degradation profile of thalidomide in alkaline medium: (organized from top to bottom) before degradation, 1, 2 and 4 hour after (only peak of phenacetin appears).

In order to demonstrate the stability of the standard analytical solutions used for assay, the samples used were maintained at room temperature for one week. The 1.0-6.0 µg/ml concentration range showed a loss not greater than 2% and RSD less than 1%.

Table 2

Recovery of thalidomide standard solution added to blank emulsion samples

Level of sample spiking	Blank formulation (g)	Amount of Thalidomide			
		Added (µg/ml)	Found (µg/ml)	Recovery (%)	RSD (%)
Low	0.300	2.0	2.03	100.27	1.042
Medium	0.300	3.0	3.03	99.75	0.748
High	0.300	4.0	4.06	100.20	0.524

n = 9 (three independent experiments for each one of the three spiking levels).

The factors and the results of the experiments of the Plackett-Burman experimental design are demonstrated in Table 1. Regarding the effect and t calculated for the factors, for pH were 0.86 and 0.52, for acetonitrile content -1.53 and -0.92 and for the detector (wavelength) 0.11 and 0.07, respectively. The factors had no significant effect, (t (0,05; 7); tabled bicaudal of 2,36), the method of quantification of thalidomide in nanoemulsion can be considered robust. The experimental error obtained from dummies factors was 1.66, close to the RSD% of precision.

The system suitability was obtained from the LC solution software®, version 1.24 SP1 (Schimadzu, corporation). The results are presented in the Table 3. The performance parameters show the method is adequate to separated thalidomide. All values are below of the specified limits [10, 15].

Table 3

System suitability

Parameters	Results
Theoretical plates	4628
Retention factor	1.020
Asymmetry	1.118
Resolution	2.359 ( ref. Phenacetin)
System repeatability	Intra-day= <0.60%
	Inter-day= 1.79%

#### **4. Conclusions**

The proposed method can be used for quantitative determination of thalidomide in nanoemulsions, which comprise a complex mixture of components with lipid nature. The method was found to be simple, precise, accurate, robust and sensitive.

#### **Acknowledgements**

This work was supported by Conselho Nacional Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq/Brasília/Brazil) (Grant: 473649/2007-1). F. A. Araújo thank CAPES/MEC/Brazil for his research fellowship.

## References

- [1] T. Eriksson, S. Bjorkman, B. Roth, A. Fyge, P. Hoglund, *Chirality* 10 (1998) 223-228.
- [2] T. Eriksson, R. Wallin, P. Hoglund, B. Roth, Z.Q. Qi, O. Ostraat, S. Bjorkman, *Am J Health Syst Pharm.* 57 (2000) 1607-1610.
- [3] M.E. Franks, G.R. Macpherson, W.D. Figg, *Lancet* 363 (2004) 1802-1811.
- [4] M. Krenn, M.P. Gamcsik, G.B. Vogelsang, O.M. Colvin, K.W. Leong, *J Pharm Sci.* 81 (1992) 685-689.
- [5] D. Hare, T. Foster, *Am Pharm. NS* 30 (1990) 35-37.
- [6] K. Bouchemal, S. Briancon, E. Perrier, H. Fessi, *Int J Pharm.* 280 (2004) 241-251.
- [7] W. Yu, E.S.T. Doegito, G. Barratt, H. Fessi, J.P. Devissaguet, F. Puisieux, *International Journal of Pharmaceutics* 89 (1993) 139-146.
- [8] H. Chen, Y. Gu, Y. Hu, *J Mater Sci Mater Med.* 19 (2008) 651-658.
- [9] T. Metz, T. Haque, H. Chen, S. Prakash, D. Amre, S.K. Das, *Drug Deliv.* 13 (2006) 331-337.
- [10] ICH Harmonised Tripartite Guideline, Validation of Analytical Procedures, Text and Methodology, ICH Q2(R1), The European Agency for the Evaluation of Medicinal Products (CPMP/ICH/381/95), 1995.
- [11] Y. Vander Heyden, A. Nijhuis, J. Smeyers-Verbeke, B.G. Vandeginste, D.L. Massart, *J Pharm Biomed Anal.* 24 (2001) 723-753.
- [12] C.S. Paim, H.M.L. Goncalves, D. Miron, J. Sippel, M. Steppe, *Chromatographia* 65 (2007) 595-599.
- [13] C.S. Paim, H. Gonçalves, A. Lange, D. Miron, M. Steppe, *Analytical Letters* 41 (2008) 571 - 581.
- [14] G.A. Shabir, *J Chromatogr A* 987 (2003) 57-66.
- [15] United States Pharmacopeia-National Formulary, USP30-NF 25, Rockville, 2007.
- [16] X. Yang, Z. Hu, S.Y. Chan, P.C. Ho, E. Chan, W. Duan, B.C. Goh, S. Zhou, *J Pharm Biomed Anal.* 39 (2005) 299-304.
- [17] S. Zhou, Y. Li, P. Kestell, J.W. Paxton, *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* 785 (2003) 165-173.





***CAPÍTULO III:***

**DESENVOLVIMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE EMULSÕES PARENTERAIS  
CONTENDO TALIDOMIDA PREPARADAS PELO MÉTODO DE EMULSIFICAÇÃO  
ESPONTÂNEA**

---



## **Development and characterization of parenteral nanoemulsions containing thalidomide prepared by spontaneous emulsification method**

F.A. Araújo<sup>1</sup>, R.G. Kelmann<sup>1</sup>, B.V. Araújo<sup>2</sup>; R.B. Finatto<sup>1</sup>, H.F. Teixeira<sup>1</sup>, L.S. Koester<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup> Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Av. Ipiranga, 2752, CEP 90.610-000, Porto Alegre, RS, Brazil.

<sup>2</sup> Universidade Federal do Pampa, BR 492 km 592, Campus Universitário, CEP 97.500-004, Uruguaiana, RS, Brazil.

\*Author to whom correspondence should be addressed: *leticia.koester@ufrgs.br*



## ABSTRACT

Thalidomide is a glutamic acid derived racemic compound. Thalidomide is approved for the management of the acute cutaneous manifestations of erythema nodosum leprosum or prevention of recurrences (type II), for the treatment of aphthous ulcers, multiple myeloma and chronic degenerative diseases (like graft-versus-host disease and Lupus). Although some of these conditions may require intravenous administration, thalidomide is difficult to formulate for parenteral delivery due to its low aqueous solubility and low stability. In this context, nanoemulsions seem to be interesting dosage forms to achieve this purpose. This study reports the development of nanoemulsions intended for intravenous administration of thalidomide. The formulations were prepared by spontaneous emulsification method and optimized with respect to thalidomide and hydrophilic emulsifier (polysorbate 80) content. The formulations were evaluated concerning droplet size, zeta potential and drug assay. The formulation containing 0.01 % Thalidomide and 0.5 % polysorbate kept its properties in a satisfactory range over the evaluated period (60 days), i.e. droplet size around 200 nm, drug content around 95% and zeta potential around  $-30\text{mV}$ . The transmission electron microscopy revealed emulsion droplets almost spherical in shape confirming the results obtained by photon correlation spectroscopy. The *in vitro* dissolution profile assessed by bulk-equilibrium reverse dialysis sac technique demonstrated a release kinetics square root time dependent, similar to that of a THD acetonitrile solution, with around 95 % THD being dissolved within 4 hours. A pharmacokinetic simulation of an intravenous infusion of 250 mL of nanoemulsion suggests that the parenteral administration of a dose as low as 25 mg may lead to therapeutic plasma concentrations of thalidomide.

*Key-words:* thalidomide, nanoemulsions, spontaneous emulsification, reverse dialysis, pharmacokinetic simulation



## 1. Introduction

Thalidomide (THD) is a glutamic acid derivative which was used during 1960s as a nonbarbiturate sedative agent. It was withdrawn due to toxic effects such as a teratogenicity and neuropathy.

Currently, the FDA approved its use for the management of the acute cutaneous manifestations of erythema nodosum leprosum or prevention of recurrences (type II) and multiple myeloma (Eriksson et al., 2001; Teo et al., 2004; Zeldis et al., 1998). During the last years, THD has been found to exhibit pharmacologic effects which suggest its use for the treatment of aphthous ulcers, sepsis, Behcet's disease and chronic degenerative diseases (like graft-versus-host disease (GVHD) and Lupus). Intravenous administration could be an alternative way to make THD available to patients with impaired gastrointestinal function like ulcerations in the upper tract (HIV patients), poor intestinal absorption (GVHD) and coma. However, due to its low aqueous solubility and low stability, no parenteral formulation is available for these patients (Schmidt et al., 1996; Jacobson et al., 1999; Eriksson et al., 2001; Teo et al., 2004; Vogelsang and Higman, 2004).

Some pharmaceutical strategies have been described to enhance stability and solubility of THD, such as its complexation with hydroxypropyl- $\beta$ -cyclodextrin (Krenn et al., 1992), the attempt to use the pure enantiomeric forms (Eriksson et al., 2000) as well as its association to polymeric carriers (Chen et al., 2008).

Submicron emulsions, known as nanoemulsions, have been used for years for parenteral nutrition and drug delivery due to their biocompatibility, relative stability, ability to solubilize high quantities of hydrophobic compounds, ability to reduce the toxicity of cytotoxic drugs and ability to protect drugs from hydrolysis and enzymatic degradation in physiologic conditions (Benita and Levy, 1993; Klang and Benita, 1998; Han et al., 2004; Waitzberg, 2006).

In this context, nanoemulsions seem to be an interesting dosage form for intravenous administration of THD. Therefore, the aim of this study was to investigate the feasibility of producing nanoemulsions for thalidomide parenteral delivery.

## **2. Materials and methods**

### *2.1 Materials and reagents*

Thalidomide reference standard (RS) (99%) and raw material (Microbiologica) were generously gifted by Fundação Ezequiel Dias (Minas Gerais, Brazil). Ultrapure water was obtained from a Milli-Q<sup>®</sup> Plus apparatus (Millipore, Billerica, USA). Acetonitrile and methanol HPLC grade were purchased from CER Brasil (São Paulo, Brazil) and Tedia (Rio de Janeiro, Brazil), respectively. Olive oil, soybean oil and soybean lecithin (Lipoid S75<sup>®</sup>) were kindly gifted by Lipoid GmbH (Ludwigshafen, Germany); purified castor oil was purchased from Sigma Aldrich (Seelze, Germany), polysorbate 80 was kindly donated by Croda (Campinas, Brazil) and glycerol was purchased from Nuclear (São Paulo, Brazil). All other chemicals and reagents were of analytical or HPLC grade.

### *2.2 High-performance liquid chromatographic analysis*

Analysis were performed in an HPLC system Prominence, which consisted of a DGU-20A5 degasser, LC-20 AT pumps, a SIL-20 A autosampler, a SPD-20AV UV/Vis detector (set at 300 nm), a CBM-20A communication bus module and a LC solution software, version 1.24 SP1 (Shimadzu, corporation). The method employed a Shimadzu<sup>®</sup> LC Shim-pack CLC-ODS (M) 4.6 mm x 25 cm (250 x 4.6 mm d.i.) column, injection volume of 20  $\mu$ L, and mobile phase composed of acetonitrile:ammonium acetate buffer (pH 5.5; 10 mM)(45:55, v/v) under an isocratic flow of 1.0 mL/min. This method was previously validated according to ICH Guidelines (ICH, 2005) and proved specific, linear ( $r^2 > 0.9998$ ), precise (R.S.D < 1.33 %), accurate (recovery from 99.8 to 100.3 %) and robust (Araújo et al., submitted for publication).



### *2.3 Determination of THD solubility in different oils*

For determination of THD solubility in different oils, excess amounts of THD were added to castor oil; medium chain triglycerides (MCT); oliva oil; soybean oil; and the mixture castor oil:MCT (1:1) in sealed vials (in triplicate). The vials were kept under constant magnetic stirring at room temperature during 24 hours. The sample was centrifuged at 15000 rpm for 120 min at 20 °C, an aliquot of the supernatant was diluted with a diluent solution composed of acetonitrile and ammonium acetate buffer (pH 5.5; 10 mM) (90:10, v/v) and THD content was assayed by HPLC.

### *2.4 THD nanoemulsions preparation*

The nanoemulsions were prepared by spontaneous emulsification (Yu et al., 1993; Bouchemal et al., 2004). Briefly, the organic phase consisting of absolute ethanol, oil (castor oil, 10.0 %, w/w), lipophilic emulsifier (soybean lecithin, 3.0 %, w/w) and THD previously homogenized, were injected into the aqueous phase consisting of water, osmotic agent (glycerol, 2.25 %, w/w) and a hydrophilic emulsifier (if required, polysorbate 80), under magnetic stirring. The magnetic stirring was maintained during 30 minutes to allow the system to reach equilibrium. The solvent proportion was 50/100, ethanol/water. Ethanol and excess water were removed by evaporation under reduced pressure until a volume of 10 mL was reached. The pH was adjusted to 5.0 – 5.5 with HCl 0.01 M. A first set of formulations was prepared with different concentrations of thalidomide (0.01, 0.015, 0.02 and 0.05%, w/w) and named THD 0.01; THD 0.015; THD 0.02, and THD 0.05 accordingly. Afterwards, another set of formulations was optimized with respect to the polysorbate 80 content (0.5, 1.0, 2.0 and 4.0 %, w/w) and named THD 0.01P0.5; THD 0.01P1.0; THD 0.01P2.0, and THD 0.01P4.0. Blank formulations were also prepared. Formulations composition is presented in table 1.

**Table 1**

Final composition of nanoemulsions

Test Formulations	% (w/w)				
	THD	Castor Oil	Soybean Lecithin	Polysorbate 80	Water q.s.p.
THD 0.01	0.01	10	3.0	-	100
THD 0.015	0.015	10	3.0	-	100
THD 0.02	0.02	10	3.0	-	100
THD 0.05	0.05	10	3.0	-	100
THD 0.01P0.5	0.01	10	3.0	0.5	100
THD 0.01P1.0	0.01	10	3.0	1.0	100
THD 0.01P2.0	0.01	10	3.0	2.0	100
THD 0.01P4.0	0.01	10	3.0	4.0	100

THD: Thalidomide; THD 0.01PX: Thalidomide 0.01% and X % of polysorbate.

### 2.5 Characterization THD nanoemulsions

The formulations were stored at 4 °C and monitored with respect to physical appearance and formation of THD crystals, particle size, zeta potential as well as drug content. The selected formulation was evaluated regarding these parameters plus viscosity, morphology and *in vitro* dissolution.

#### 2.5.1 Particle size analysis

The mean particle size and polydispersity index were measured at 25 °C by photon correlation spectroscopy (PCS) using a Malvern Nanosizer/Zetasizer® nano-ZS ZEN 3600 (Malvern Instruments, USA). Each 20 µl sample was diluted in 10 mL of ultrapure water. The analyses were performed three times to determine mean values.

### *2.5.2 Zeta potential measurement*

The zeta potential was measured by electrophoretic mobility using Malvern Nanosizer/Zetasizer® nano-ZS ZEN 3600 (Malvern Instruments, USA). All analyses were done in triplicate and each 20 µl sample was diluted in 10 mL of an ultra-filtered (0.22 µm) solution of NaCl (1mM).

### *2.5.3 THD assay*

The THD content of the emulsions was assayed by the HPLC method as previously described. A fixed amount of the emulsion (0.500 g) was diluted in a diluent solution composed of acetonitrile:ammonium acetate buffer (pH 5.5; 10 mM) (90:10, v/v) and 20 µl from the resulting solution was injected into the HPLC.

### *2.5.4 Transmission Electronic Microscopy*

One drop of THD nanoemulsion was placed on a carbon-coated copper grid (200 mesh) overlaid with 1 % formwar in chloroform, stained by 2.0 % uranyl acetate aqueous solution and examined by transmission electronic microscopy using a JEM-1200 EXII instrument (JEOL, Tokio, Japan).

### *2.5.5 Viscosity*

The rheological measurements were carried out in a AVS 350 viscometer (Schott-Geräte, Hofheim, Germany) equipped with a capillary tube Ic (viscosimeter constant,  $k= 0.035$ ). Seven milliliters of the emulsion (adjusted to  $25 \pm 0.1$  °C) were poured into the filling tube and transferred to the capillary tube by gentle suction. The time was recorded, in seconds, for the liquid to flow from the upper to the lower mark in the capillary tube. The analyses were done in triplicate.

### *2.6 In vitro dissolutions studies*

THD in vitro dissolution from the selected formulation was assessed by the bulk-equilibrium reverse dialysis sac technique (Benita and Levy, 1993; Chidambaram and Burgess, 1999; Klang and Benita, 1998). For comparison purposes, an acetonitrile solution of THD in the same concentration was also evaluated.

The device consists of glass dissolution vessels inside an acrylic box water bath with temperature and magnetic stirrer controller. The stirring was performed with teflon coated magnetic stir bars. The method consists of adding 10 ml of the thalidomide nanoemulsion directly placed into the vessel containing 400 ml of ammonium acetate buffer 0.1 mM. Dialysis bags (Spectrum, 2009) containing 5 mL of buffer solution (n=3) were sealed at both ends with medicell clips (Spectrum, 2009) and placed at the bottom of the dissolution vessels. The dialysis bags were kept immersed in the same buffer for 24 hours. The study was carried out at  $37 \pm 0.5^\circ\text{C}$  using the dissolution device mentioned above under an agitation speed of 200 rpm. At predetermined time intervals (30, 40, 60, 120, 180 and 240 minutes), 0.5 mL of the solution inside of the dialysis bag and 0.5 mL of the surrounding medium were collected and assayed by HPLC as already described.

The release kinetics of THD from the nanoemulsion was evaluated by zero order ( $Q_t = Q_0 + k_0t$ ), first order ( $\ln Q_t = \ln Q_0 + K_1t$ ) and Higuchi ( $Q_t = k_H t^{1/2}$ ) equations considering the points of percent dissolved up to 180 minutes, since those precede the beginning of the profile plateau.

### *2.7 Simulation of the in vivo profile of the optimized THD nanoemulsion*

To study the applicability of the THD0.01P0.5 formulation, its intravenous administration was simulated (Scientist version 3.0) using the open model of one compartment considering the administration of 25 mg (250 mL of formulation) given as continuous infusion during 2 hours, a first order elimination ( $k_e = 0.143 \text{ h}^{-1}$ ) and a volume of distribution (Vd) of 20 L (Teo et al., 2004). The infusion rate is in accordance with the recommendations for commercial lipid emulsions with 10 % of oil phase (Liposyn II, 2010). For comparison purposes, the simulation of oral doses of 25 mg and 200 mg were also fitted using the modified equation of compartmental analysis presented by Teo and co-workers (2004) (Eq. 2), considering the following parameters: faster rate constant ( $k_{\text{fast}}$ ) of  $0.23 \text{ h}^{-1}$  for both 25 mg and 200 mg. Slower rate constant ( $k_{\text{slow}}$ ) of  $0.639 \text{ h}^{-1}$  for a dose of 25 mg and of  $0.077 \text{ h}^{-1}$  for a dose of 200 mg. A  $k_e$  of  $0.143 \text{ h}^{-1}$  and a Vd of 20 L for both doses.

## 2.8 Statistical Analysis

A statistical analysis of the differences between various treatments was performed using analysis of variance (ANOVA). A paired *Student's t-test* was also used once required. A 0.05 level of probability was taken as the level of significance.

## 3. Results and discussion

### 3.1 Determination of THD solubility in oils

The choice of the oil core is an important step on preformulation studies. The oil solubility of THD in the selected oils is presented in fig. 1. Castor oil presented the best results, performing a solubilization of approximately 0.250 mg of Thalidomide per g of oil. The mixture of Castor Oil/MCT (50:50), which is reported to produce a decrease in the castor oil viscosity and interfacial tension of the oil phase (Jumaa and Müller, 1998; Jumaa and Müller 1999) was the second best alternative (0.200 mg/g). The choice of a suitable oil phase was limited to castor oil.

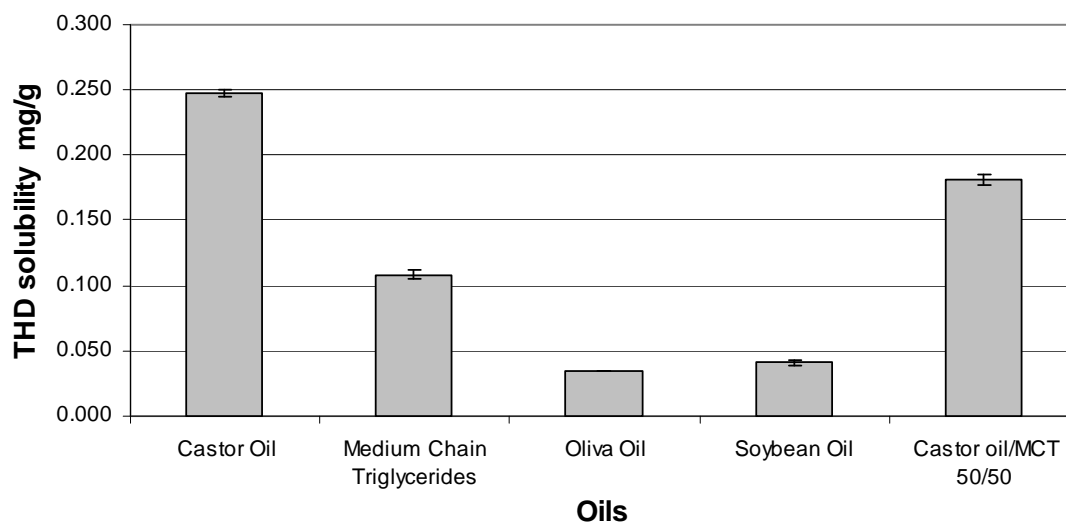


Fig. 1. Thalidomide solubility in castor oil, MCT, oliva oil, soybean oil and castor oil/MCT 50/50.

### 3.2 Preparation of THD nanoemulsions

After settling the oil core (castor oil, 10 % w/w), formulation studies were performed to define the other excipients. Lecithins are usually the best candidates as emulsifiers due to their current use in commercial lipid emulsions. Based on preliminary manufacturing trials and according to previous literature (Shi et al., 2009; Jang et al., 2009), soybean lecithin was chosen and employed at a permitted concentration of 3.0 % (w/w) (FDA, 2008). It produced milky, fluid and apparently stable formulations at first. Glycerol (2.5 %, w/w) was also added as osmotic agent. Then, four formulations were prepared in triplicate in view to optimize THD content (0.01%, 0.015%, 0.02% and 0.05%) (Table 1)

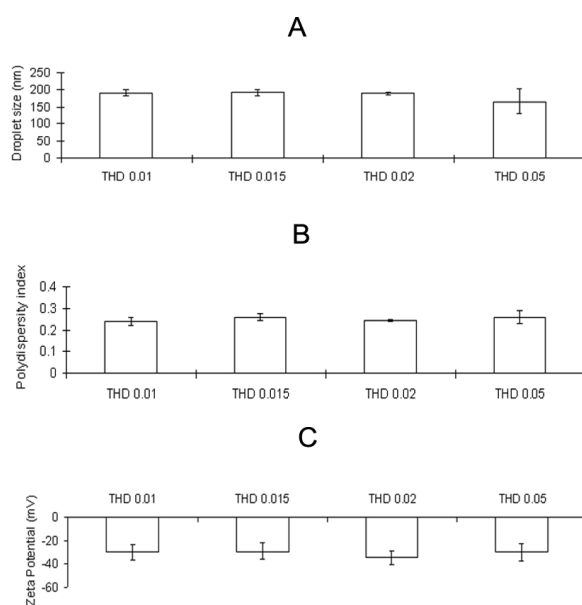


Fig. 2. (A) mean droplet size ( $\pm$  S.D.), (B) polydispersity index ( $\pm$  S.D.) and (C) zeta potential of formulations containing increasing amounts of THD (0.01, 0.015, 0.02 and 0.05 %) (\*significantly different (ANOVA, (Tukey test,  $p \leq 0.05$ )).

For parenteral emulsions, the droplet size and polydispersity index (PI) are important physicochemical parameters. Large particle sizes are clinically unacceptable due to emboli formation (Benita and Levy, 1993; Floyd, 1999). As can be observed in fig. 2A, photon correlation spectroscopy showed that after seven days of preparation, the average size of the emulsions was in the range of 112 to 196 nm, which is a satisfactory range and classifies the formulations as indeed nanoemulsions (Benita and Lewi, 1993; Floyd, 1999; Tamilvanan, 2009). Fig. 2B also shows that after preparation, the formulations presented polydispersity indexes around 0.250. Polydispersity index (PI) characterizes the disperse systems with respect to the deviation from the average size, and values up to 0.250 are acceptable for parenteral emulsions (Müller et al., 2004). The zeta potential is a stability indicative parameter in colloidal systems like submicron emulsions (Benita e Levy, 1993; Tamilvanan and Benita, 2004; Tamilvanan, 2009). An emulsion reaches the maximum stability when the zeta potential is greater than 30 mV (in module) (Buznello et al., 2000; Wang et al., 2006). As can be observed in Fig. 2C, soybean lecithin with its negatively charged phospholipids was able to produce a satisfactory negative surface potential for all formulations. Blank emulsions particle size and potential zeta were also evaluated (data not shown). The results showed no significant differences when compared to the THD emulsions.

All formulations kept its milky aspect with no sign of creaming or flocculation upon storage (4 °C). Nevertheless, at day 7, a crystallization process was capable of being seen in the 0.05 % THD formulation. The THD content of the nanoemulsions is shown in fig. 3. The formulations were monitored until the observation of statistically significant differences. Even though the values of droplet size, polydispersity index (PI) and zeta potential remained quite similar (data not shown), the higher content formulations (> 0.02 %, w/w) presented a large decrease of THD concentration after 7 days of preparation. At day 45, a significant decrease of THD content was observed in all but the 0.01 % THD formulation. This formulation was monitored up to 60 days and also presented a

statistically significant decrease in its content as compared with the first day, although no crystal was visually observed. No degradation of THD was observed by HPLC in these analyses.

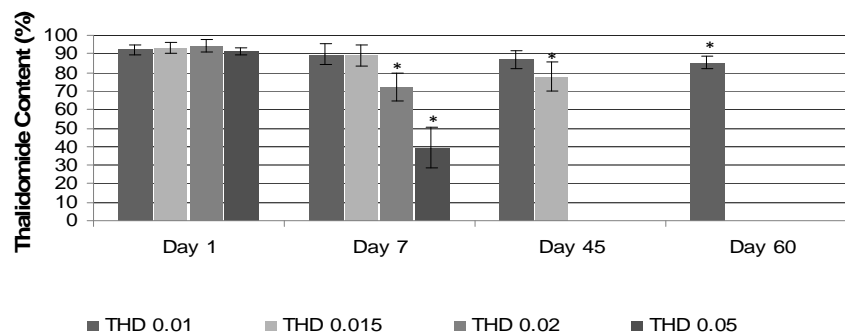


Fig. 3. Thalidomide content after 1, 7, 45 and 60 days of storage (\*significantly different (ANOVA, (Tukey test,  $p \leq 0.05$ )).

### 3.3 Optimization of THD nanoemulsions with respect to the co-emulsifier content

Considering THD low solubility in the oil phase, the drug might be located at the oil-water interface. In this context, the use of a hydrophilic co-emulsifier was tested in view to create a more stabilized interface and improve the stability of the 0.01 % formulation. Increasing amounts of polysorbate 80 were added (0.5, 1.0, 2.0 and 4.0 %, w/w) (Table 1) at permitted concentrations for intravenous administration. As can be observed in Fig. 4, the results of droplet size and polydispersity index are within the specification for parenteral emulsions, that is, around 154 nm and 0.240 (P.I.), respectively. No significant change was observed for these parameters during 60 days of storage. No significant difference in zeta potential was observed during storage of the nanoemulsions either (Fig. 5), and the values remained within a satisfactory range (-22 to -56 mV).



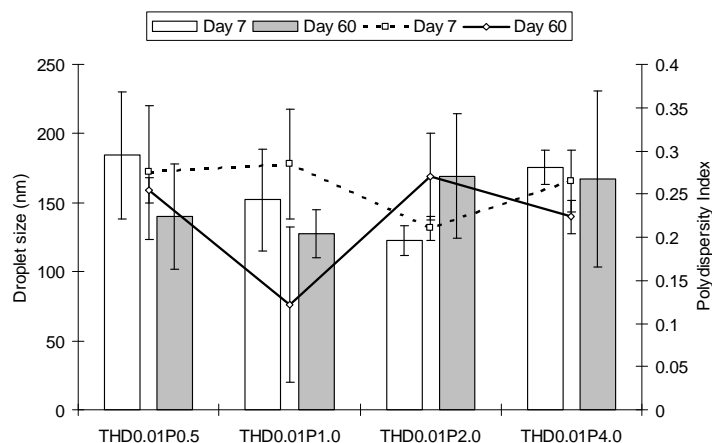


Fig. 4. Results for mean droplet size ( $\pm$  S.D.) and polydispersity index values ( $\pm$  S.D.) of formulations containing increasing amounts of polysorbate after 7 days (blank columns and squares) and 60 days (grey columns and diamond) of preparation (\*significantly different (Paired Samples (t-test,  $p < 0.05$ )).

With respect to the drug content, as can be observed in Fig. 6, at a 0.5 % (w/w) level, polysorbate 80 increased the stability of the 0.01 % THD nanoemulsion. On the other hand, a significant decrease of THD content was observed after 45 days as polysorbate 80 was employed in larger concentrations ( $> 1.0$  %, w/w).

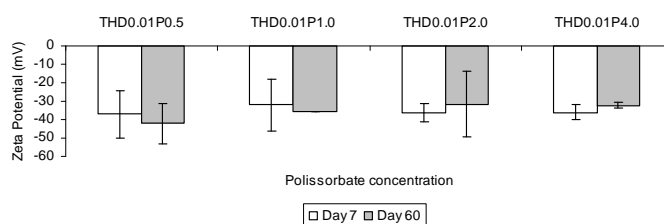


Fig. 5. Zeta potential results of compositions containing increasing amounts of polysorbate. White columns: measures ( $\pm$  S.D.) after 7 days. Gray columns: measures ( $\pm$  S.D.) after 60 days (\*significantly different (Paired Samples (t-test,  $p \leq 0.05$ )).

The presence of polysorbate 80 at higher concentrations (1.0, 2.0 and 4.0 %, w/v) decreased THD content over time and a hypothesis for this phenomenon is the reorganization of the system and possible formation of micelles in aqueous medium which may promote drug transfer from interface to aqueous phase. Crystal formation would be a result of drug saturation, nucleation and finally drug crystallization (Weiss, 2000; Han et al., 2004; Meldrum and Colfen, 2008, Giffard et al., 2009). Further studies are necessary to explain this phenomenon.

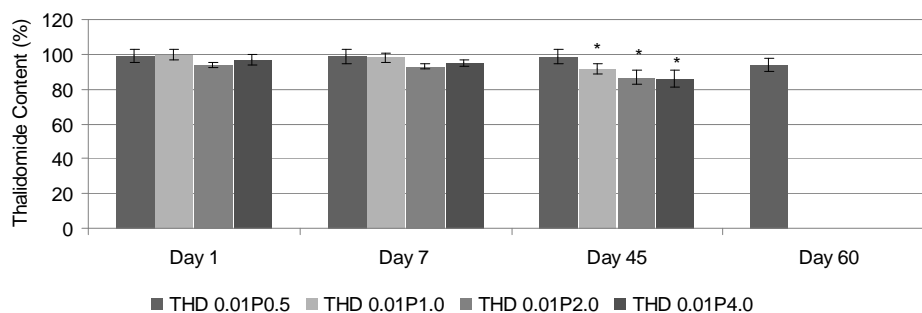


Fig. 6. Thalidomide content after 45 days of storage (\*significantly different (ANOVA, (Tukey test,  $p \leq 0.05$ )).

Thus, the formulation containing 0.01 % THD and 0.5 % polysorbate 80 (THD0.01P0.5) was selected for further characterization. This formulation presented a viscosity of 2.9 mPa.s, a value acceptable for parenteral administration, i.e, below the 3.9 mPa.s (Nielloud et al., 1996), and its morphology is illustrated at fig 7. The image confirms the results obtained by photon correlation spectroscopy, showing a homogeneous distribution of small, spherical globules around 200 nm.

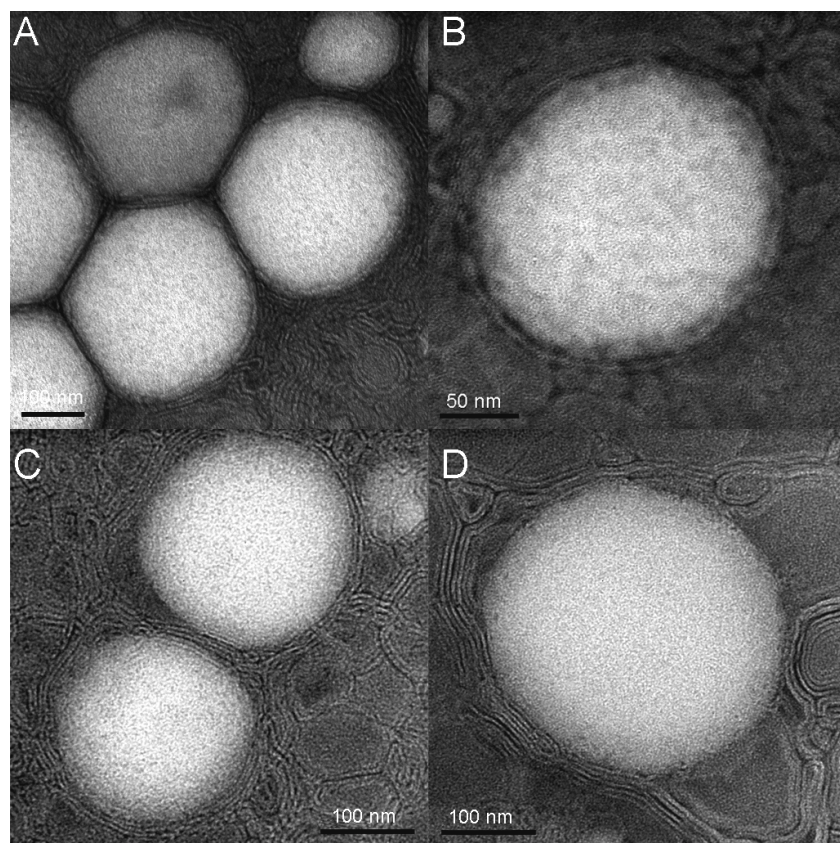


Fig. 7. Transmission electron photomicrograph of the THD nanoemulsion with polysorbate 0.5%: A, 300Kx, and B, 500Kx; Blank nanoemulsion with polysorbate 0.5%: C, 300Kx, and D, 300Kx.

#### 3.4 THD release from optimized nanoemulsion

Preliminary tests were conducted in order to determine the best test conditions. The conventional sac dialysis method was not possible to execute since less than 30 % of THD dissolved after 24 hours at 37 ° C. In fact, the conventional dialysis technique may lead to a violation of *sink* conditions, since the membrane surface area available for transport from the donor to the receiver phase is limited as compared with the surface area available for transport from the dispersed phase droplets to the continuous phase (Chidambaram and Burgess, 1999). Ammonium acetate 1mM pH 5.5 was chosen as release medium (Schumacher et al, 1965; Yang et al., 2005) and no significant loss of THD was observed during the experiments. The dissolution profiles of THD 0.01P0.5 and THD 0.01 % acetonitrile solution were assessed during 240 minutes. Acetonitrile was found

compatible with the membrane material (Spectrum, 2009), and was selected to prepare the control formulation.

As one can observe, the dissolution profiles were almost superimposable (Fig. 8), with more than 80 % of THD being dissolved after 2 hours. Therefore, the dissolution of THD from the nanoemulsion is supposed to correspond to that of a THD solution, as expected for an intravenous emulsion. Nevertheless, it is worth mentioning that even though the presence of the samples in the outer vessel promotes an infinite dilution, the dialysis membrane accomplishes a physical separation of the THD solution or THD nanoemulsion to the analyzed medium. That may explain why both release kinetics were found to fit to the Higuchi model ( $R^2 > 0.99$ ), which corroborates a diffusion mechanism (Costa and Lobo, 2001).

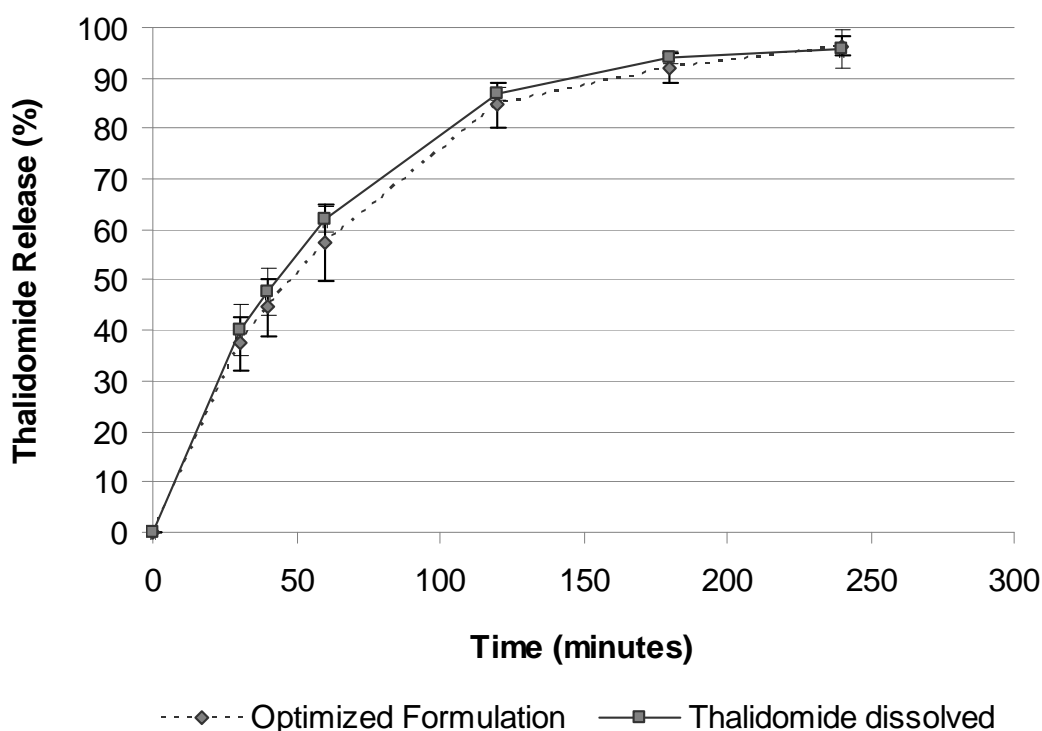


Fig. 8. *In vitro* dissolution profiles of optimized nanoemulsion (dotted lines) and THD dissolved in acetonitrile (black line) using bulk-equilibrium reverse dialysis sac technique. Mean  $\pm$  S.D; n=3.

### 3.5 Simulation of the pharmacokinetic profile of the optimized formulation.

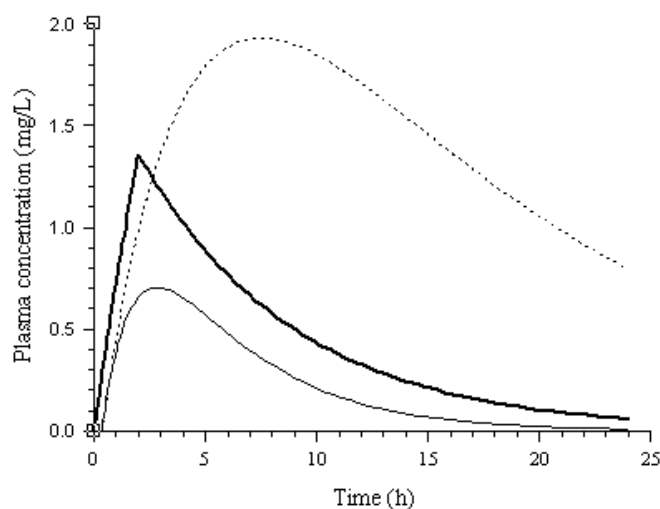


Fig. 9. Linear simulated profile of THD. From top to bottom: dotted line: oral dose of 200 mg; thick line: 2-h i.v. infusion of 25 mg, and thin line: oral dose of 25 mg. The following parameters were used in the simulations: 25 mg i.v. ( $k_e = 0.143 \text{ h}^{-1}$ ;  $V_d = 20 \text{ L}$ ), 25 mg oral [ $k_{\text{fast}} = 0.23 \text{ h}^{-1}$ ;  $k_{\text{slow}} = 0.639 \text{ h}^{-1}$  (fast absorption);  $V_d = 20 \text{ L}$ ], 200 mg oral [ $k_{\text{fast}} = 0.23 \text{ h}^{-1}$ ;  $k_{\text{slow}} = 0.077 \text{ h}^{-1}$  (slow absorption);  $V_d = 20 \text{ L}$ ]

The Figure 9 presents the linear simulated profile of THD (dose of 25 mg) after 2-hour I.V. infusion of the THD 0.01 % formulation. As can be observed, a maximum plasma concentration ( $C_{\text{max}}$ ) of 1.358 mg/L was predicted at a dosage of 25 mg (corresponding to 250 mL of the 0.01 % THD nanoemulsion). This value approaches that of a traditional oral administration of 200 mg THD ( $C_{\text{max}} = 1.9285 \text{ mg/L}$ ), whose profile has been formerly simulated by Teo and co-workers (2004) as well. These findings corroborates that effective i.v. doses can be lower than the oral doses. THD is known for presenting a flip-flop phenomenon for high oral doses, that is, the elimination rate is faster than the absorption rate, and in this case, the faster rate constant represents the elimination phase. This situation was taken into consideration in the simulations, as proposed by Teo and co-workers (2004) and may explain why Bowcock and co-workers (2008) recently found that the dose

of 25 mg was effective for the treatment of myeloma in elderly patients with a negligible risk of neuropathy. It is worth noting that the oral dose of 25 mg is 8 times lower than that of 200 mg, but leads to a  $C_{\max}$  (0.6917 mg/L) that is only 2.8 times lower. Estimated  $C_{\max}$  and AUC for the i.v. profile are twice higher than that of the same oral dose (25 mg). The calculated AUC of the oral 25 mg, i.v. 25 mg and oral 200 mg were 5.5 mg/L/h, 10.927 mg/L/h and 38.5 mg/L/h, respectively. Taken together, the simulated pharmacokinetics profiles may suggest that even if THD loading to the nanoemulsions is quite limited (0.01 %), such drug content might allow the administration of a feasible volume of parenteral emulsion leading to therapeutic plasma concentrations. The THD nanoemulsion formulation could even be more advantageous for the treatment of medical conditions where the intestinal absorption is impaired, as in GVHD.

#### **4. Conclusions**

In this study, the formulation of THD in intravenous nanoemulsions was shown difficult because of the drug poor solubility in oils. Based on solubility studies, castor oil was selected as oil core. Formulations prepared with castor oil (10 %, w/w) lecithin (3.0 %, w/w) and increasing amounts of THD (from 0.01 to 0.05 %) presented droplet size, polydispersity index and zeta potential feasible to i.v. administration. Nevertheless, drug crystallization was observed for the higher content formulation and a significant decrease of THD content was observed for the 0.01 % THD formulation at 60 days of storage. The addition of polysorbate 80 improved the stability of this formulation only at a 0.5 % (w/w) level. Higher polysorbate 80 concentrations led to a significant decrease on drug loading, possibly by facilitating drug interaction with the aqueous phase. The dissolution profile of the optimized formulation was similar to that of a THD solution and revealed kinetics compatible to the Higuchi model. Moreover, the pharmacokinetic simulation of the intravenous infusion of 250 mL of the selected formulation (0.01 % THD) has showed that the parenteral administration of a dose as low as 25 mg may achieve therapeutic plasma concentrations.

## Acknowledgements

This work was supported by Conselho Nacional Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq/Brasília/Brazil) (Grant: 473649/2007-1). F.A. Araújo thank CAPES/MEC/Brazil for his research fellowship. Authors would like to thank Prof. Silvia Guterres and Tânia Pasa for particle size and zeta potential analysis.

## References

- Araújo, F. A., Finatto, R. B., Ferronato, K., Oliveira, L. K., Kelmann, R. G., Teixeira, H. F., Koester, L. S. Submitted for publication. Determination of Thalidomide in parenteral nanoemulsions: Development and validation of an HPLC method, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*.
- Benita, S., Levy, M.Y., 1993. Submicron emulsions as colloidal drug carriers for intravenous administration: comprehensive physicochemical characterization. *J Pharm Sci* 82, 1069-1079.
- Bouchemal, K., Briançon, S., Perrier, E., Fessi, H., 2004. Nano-emulsion formulation using spontaneous emulsification: Solvent, oil and surfactant optimisation. *International Journal of Pharmaceutics* 280, 241-251.
- Bowcock, S.J., Minchom, A., Yates, L.R., Ryali, M.M. 2008. Ultra low dose of thalidomide in elderly patients with myeloma. *British Journal of Haematology* 141, 120-122.
- Buszello, K., Harnisch, S., Muller, R.H., Muller, B.W., 2000. The influence of alkali fatty acids on the properties and the stability of parenteral O/W emulsions modified with solutol HS 15. *Eur J Pharm Biopharm* 49, 143-149.
- Chen, H., Gu, Y., Hu, Y., 2008. Comparison of two polymeric carrier formulations for controlled release of hydrophilic and hydrophobic drugs. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine* 19, 651-658.

- Chidambaram, N., Burgess, D.J., 1999. A novel in vitro release method for submicron sized dispersed systems. *AAPS PharmSci* 1, E11.
- Costa, P., Sousa Lobo, J.M., 2001. Modeling and comparison of dissolution profiles. *Eur J Pharm Sci* 13, 123-133.
- Eriksson, T., Bjorkman, S., Roth, B., Hoglund, P., 2000. Intravenous formulations of the enantiomers of thalidomide: pharmacokinetic and initial pharmacodynamic characterization in man. *J Pharm Pharmacol* 52, 807-817.
- Eriksson, T., Bjorkman, S., Hoglund, P., 2001. Clinical pharmacology of thalidomide. *Eur J Clin Pharmacol* 57, 365-376.
- FDA, 2008 Food and Drug Administration (FDA), 2008. Inactive Ingredient Database. Available at: <http://www.accessdata.fda.gov/scripts/cder/iig/index.cfm> (November 15, 2008).
- Floyd, A.G., 1999. Top ten considerations in the development of parenteral emulsions. *Pharm Sci Technolo Today* 4, 134-143.
- Franks, M.E., Macpherson, G.R., Figg, W.D., 2004. Thalidomide. *Lancet* 363, 1802-1811.
- Giffard, M., Delfosse, V., Sciara, G., Mayer, C., Cambillau, C., Hajji, M.E., Castro, B., Bonneté, F., 2009. Surfactant poloxamer 188 as a new crystallizing agent for urate oxidase. *Crystal Growth and Design* 9, 4199-4206.
- Han, J., Davis, S.S., Papandreou, C., Melia, C.D., Washington, C., 2004. Design and evaluation of an emulsion vehicle for paclitaxel. I. Physicochemical properties and plasma stability. *Pharm Res* 21, 1573-1580.
- Jacobson, J.M., Spritzler, J., Fox, L., Fahey, J.L., Jackson, J.B., Chernoff, M., Wohl, D.A., Wu, A.W., Hooton, T.M., Sha, B.E., Shikuma, C.M., MacPhail, L.A., Simpson, D.M., Trapnell, C.B., Basgoz, N., 1999. Thalidomide for the treatment of esophageal aphthous ulcers in patients with



human immunodeficiency virus infection. National Institute of Allergy and Infectious Disease AIDS Clinical Trials Group. *J Infect Dis* 180, 61-67.

Jang, J.H., Kim, C.K., Choi, H.G., Sung, J.H., 2009. Preparation and evaluation of 2-(allylthio)pyrazine-loaded lipid emulsion with enhanced stability and liver targeting. *Drug Dev Ind Pharm* 35, 363-368.

Jumaa, M., Müller, B.W., 1998. The effect of oil components and homogenization conditions on the physicochemical properties and stability of parenteral fat emulsions. *International Journal of Pharmaceutics* 163, 81-89.

Jumaa, M., Müller, B.W., 1999. Influence of the non-ionic surfactant PEG-660-12-hydroxy stearate on the surface properties of phospholipid monolayers and their effect on lipid emulsion stability. *Colloid and Polymer Science* 277, 347-353.

Klang, S., Benita, S., 1998. Design and evaluation of submicron emulsions as colloidal drug carriers for intravenous administration. *Submicron Emulsions in Drug Targeting and Delivery*, 119-152.

Krenn, M., Gamcsik, M.P., Vogelsang, G.B., Colvin, O.M., Leong, K.W., 1992. Improvements in solubility and stability of thalidomide upon complexation with hydroxypropyl- $\beta$ -cyclodextrin. *Journal of Pharmaceutical Sciences* 81, 685-689.

Liposyn<sup>®</sup> II. Intravenous fat emulsion. Available at:

[http://www.hospira.sk/Files/TPN\\_Liposyn\\_II.pdf](http://www.hospira.sk/Files/TPN_Liposyn_II.pdf). Accessed in march 2010.

Meldrum, F.C., Cölfen, H., 2008. Controlling mineral morphologies and structures in biological and synthetic systems. *Chemical Reviews* 108, 4332-4432.

Muller, R.H., Schmidt, S., Buttle, I., Akkar, A., Schmitt, J., Bromer, S., 2004. SolEmuls-novel technology for the formulation of i.v. emulsions with poorly soluble drugs. *Int J Pharm* 269, 293-302.

Nielloud, F., Marti-Mestres, G., Laget, J.P., Fernandez, C., Maillols, H., 1996. Emulsion formulations: Study of the influence of parameters with experimental designs. *Drug Development and Industrial Pharmacy* 22, 159-166.

Schmidt, H., Rush, B., Simonian, G., Murphy, T., Hsieh, J., Condon, M., 1996. Thalidomide inhibits TNF response and increases survival following endotoxin injection in rats. *J Surg Res* 63, 143-146.

Schumacher, H., Smith, R.L., Williams, R.T., 1965b. The metabolism of thalidomide: the spontaneous hydrolysis of thalidomide in solution. *British Journal of Pharmacology* 25, 324-337.

Shi, S., Chen, H., Cui, Y., Tang, X., 2009. Formulation, stability and degradation kinetics of intravenous cinnarizine lipid emulsion. *International Journal of Pharmaceutics* 373, 147-155.

Spectrum Laboratories Inc. Laboratory Product Catalog. Available at: <<http://www.spectrapor.com/lit/2007Catalog.pdf>> [April 01, 2009].

Tamilvanan, S., 2009. Formulation of multifunctional oil-in-water nanosized emulsions for active and passive targeting of drugs to otherwise inaccessible internal organs of the human body. *Int J Pharm* 381, 62-76.

Tamilvanan, S., Benita, S., 2004. The potential of lipid emulsion for ocular delivery of lipophilic drugs. *Eur J Pharm Biopharm* 58, 357-368.

Teo, S.K., Colburn, W.A., Tracewell, W.G., Kook, K.A., Stirling, D.I., Jaworsky, M.S., Scheffler, M.A., Thomas, S.D., Laskin, O.L., 2004. Clinical pharmacokinetics of thalidomide. *Clin Pharmacokinet* 43, 311-327.

Vogelsang, G.B., Higman, M.A., 2004. Chronic graft versus host disease. *British Journal of Haematology* 125, 435-454.

Waitzberg, D.L., Torrinhas, R.S., Jacintho, T.M., 2006. New parenteral lipid emulsions for clinical use. *Journal of Parenteral and Enteral Nutrition* 30, 351-367.

- Wang, J.J., Sung, K.C., Hu, O.Y.P., Yeh, C.H., Fang, J.Y., 2006. Submicron lipid emulsion as a drug delivery system for nalbuphine and its prodrugs. *Journal of Controlled Release* 115, 140-149.
- Weiss, J., 2000. Mass transport phenomena in oil-in-water emulsions containing surfactant micelles: ostwald ripening. *Langmuir* 16, 6833-6838.
- Yang, X., Hu, Z., Sui, Y.C., Ho, P.C., Chan, E., Duan, W., Boon, C.G., Zhou, S., 2005. Determination of thalidomide by high performance liquid chromatography: Plasma pharmacokinetic studies in the rat. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 39, 299-304.
- Yu, W., Tabosa do Egito, E.S., Barratt, G., Fessi, H., Devissaguet, J.P., Puisieux, F., 1993. A novel approach to the preparation of injectable emulsions by a spontaneous emulsification process. *International Journal of Pharmaceutics* 89, 139-146.
- Zeldis, J.B., Williams, B.A., Thomas, S.D., Elsayed, M.E., 1999. S.T.E.P.S.: a comprehensive program for controlling and monitoring access to thalidomide. *Clin Ther* 21, 319-330.



***CAPÍTULO IV:***

**CARACTERIZAÇÃO DOS CRISTAIS DE TALIDOMIDA OBTIDOS DAS  
NANOEMULSÕES PARENTERAIS**

---



# Characterization of thalidomide crystals obtained from parenteral nanoemulsions

F.A. Araújo, R.G. Kelmann, H.F. Teixeira, L.S. Koester\*

Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Av. Ipiranga, 2752, 90.610-000, Porto Alegre, RS.

\* Correspondence author: [leticia.koester@ufrgs.br](mailto:leticia.koester@ufrgs.br). Tel. +55 51 3308 5278

---

## ABSTRACT

A previous study aimed to develop a parenteral nanoemulsion for thalidomide delivery. However, a thalidomide content decrease and a crystalline sedimentation were observed. This note aims to characterize these crystals and evaluate whether the kind of polymorph employed could influence nanoemulsion formulation. Regardless of the polymorph employed ( $\beta$ - or  $\alpha$ -), drug crystallization occurs in the  $\alpha$ -form. THD solubility in oils was not influenced by the polymorphic form.

*Keywords:* thalidomide, nanoemulsions, polymorphism

---





Thalidomide (THD) is a racemic compound derived from glutamic acid which presents two different polymorphic forms named  $\alpha$ - and  $\beta$ -thalidomide (Reepmeyer et al, 1994). A previous work of our research group intended to develop a parenteral nanoemulsion for THD delivery (Araújo et al., Submitted for publication a). A THD content decrease was detected by HPLC assay and crystalline sediment was verified. These crystals presented a different crystal habit compared to that of the raw material used. In this context, the main goal of this work was to characterize these crystals, comparing those with the bulk drug and evaluate whether THD polymorphism could influence the nanoemulsion formulation.

THD was kindly donated by Fundação Ezequiel Dias (Brazil) and incorporated into the nanoemulsion by spontaneous emulsification method (Yu et al., 1993). The formulations were made of (% w/w): THD  $\beta$ -polymorph (0.05), castor oil (10), soybean lecithin (3.0), glycerol (2.5) and water (q.s.p 100) (Araujo et al., Submitted for publication a). THD drug crystals were collected at the bottom of the packing after 45 days of storage by filtration in PVDF 0.4  $\mu\text{m}$  pore size membranes and characterized by optical microscopy, differential scanning calorimetry (DSC), fourier transformed infrared spectroscopy (FTIR) and X-ray diffraction (XRD).

Optical microscope images (Light microscopy Zeiss Primo/Star Canon A650IS Digital Camera) (Figure 1) revealed crystals with a crystal habit different from that of the raw material ( $\beta$ -polymorph). THD crystals presented a tabular prismatic form with a well-defined surface (Fig. 1C), similar to that of  $\alpha$ -polymorph (Fig. 1A).

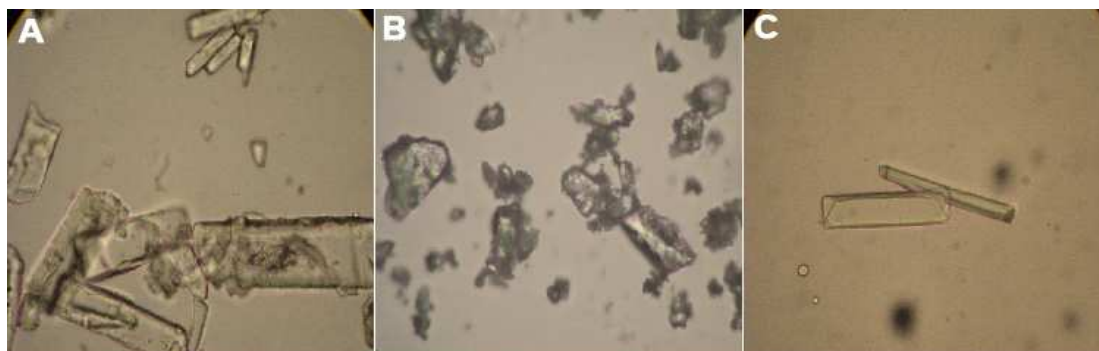


Fig. 1. Photomicrographs of THD crystals in 400x magnification: A, bulk  $\alpha$ -polymorph; B, bulk  $\beta$ -polymorph; C, nanoemulsion crystals

Approximately 1.0 mg samples of THD were weighed and placed in a sample aluminum pan, sealed and analyzed by DSC (Shimadzu DSC 60) under nitrogen atmosphere (constant flow of 50 mL min<sup>-1</sup>), with speed of 10°C.min<sup>-1</sup> and temperature range from 260°C to 285°C. DSC thermograms from the two THD polymorphs and nanoemulsion crystals are shown in Figure 2. All samples presented only one endothermic event placed at  $275 \pm 1$  °C. This behavior has already been described (Lara-Ochoa et al., 2007 and Carini et al., 2009) and can be possibly explained by the enantiotropy of both polymorphs. Although this method was insensitive to distinguish the polymorphs, it may discard the presence of impurities, since no other endothermic peak or degradation event was observed.

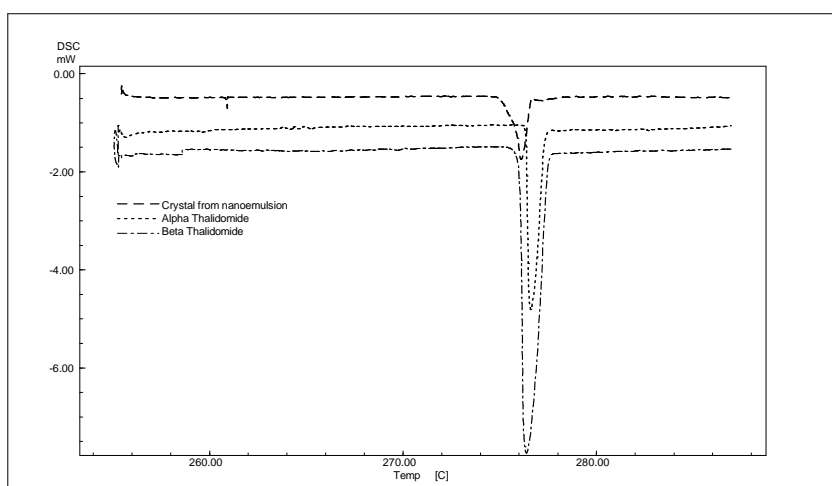


Fig. 2. DSC results from bulk materials and nanoemulsion crystals

The infrared spectra were recorded in a FT-IR spectrophotometer Spectrum BX, Perkim-Elmer (Massachusetts, USA), over a range of  $3800\text{--}500\text{cm}^{-1}$ . Both polymorphs have different FT-IR spectra, presenting characteristic absorption bands. The  $\alpha$ -polymorphic form presents stretching features around  $3200\text{cm}^{-1}$  (NH),  $3100\text{cm}^{-1}$  (NH) and  $860\text{cm}^{-1}$  (CH), while  $\beta$ -polymorph presents bands in  $3250\text{cm}^{-1}$  (NH) and  $750\text{cm}^{-1}$  (CH) (Allen and Trotter, 1970; Reepmeyer et al., 1994; Lara-Ochoa et al., 2007; Carini et al., 2009). The crystals collected from nanoemulsion presented characteristic bands from  $\alpha$ -polymorph. THD crystallization as  $\alpha$ -polymorph was characterized mainly by  $3200$  and  $3100\text{cm}^{-1}$  bands (Figure 3).

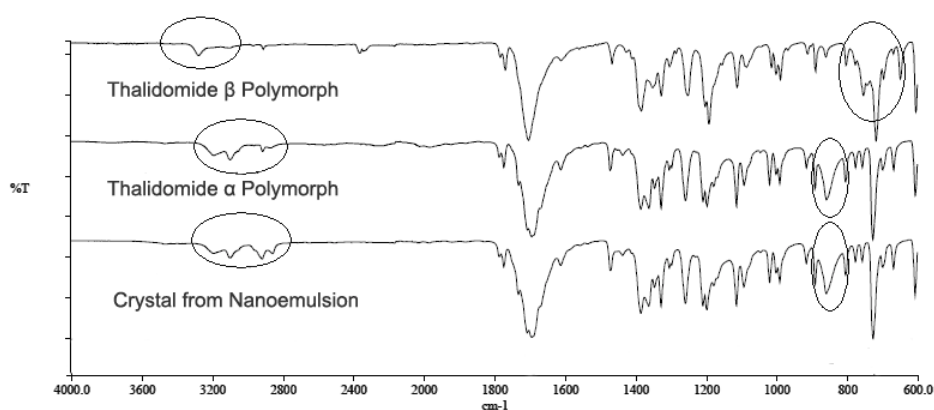


Fig. 3. FTIR spectra of thalidomide  $\beta$ -polymorph,  $\alpha$ -polymorph and nanoemulsion crystals

The XRD experiments were carried out on a Siemens D5000 diffractometer (Siemens, Berlin, Germany) with  $\text{CuK}\alpha$  radiation ( $\lambda = 1.5406 \text{ \AA}$ ) at room temperature in a Bragg–Brentano  $\theta - 2\theta$  geometry, at 40 kV and 20mA with a scan range between  $8^\circ$  and  $40^\circ$  and constant step, step size/time of  $0.02^\circ/2\theta/\text{s}$ . Diffractograms from all samples are shown in Figure 4. Both angles and interplanar distances obtained from the crystals and reference polymorphs ( $\alpha$  and  $\beta$ ) are disclosed in Table 1. As can be observed, THD crystals from nanoemulsion clearly demonstrated  $\alpha$ -

polymorphic pattern which confirms hypothesis of crystal growth as a different polymorph from that used for nanoemulsion preparation ( $\beta$ -THD).

Table 1

Comparison of  $2\theta$  ( $^\circ$ ) values and interplanar distances (d) ( $\text{\AA}$ ) of  $\alpha$ -,  $\beta$ -polymorph, and crystal from nanoemulsion, calculated from characteristic peaks:

Experimental Results						Reepmeyer et al., 1994				Carini et al., 2008			
$\alpha$ -polymorph		$\beta$ -polymorph		Nanoemul- sion crystals		$\alpha$ -polymorph		$\beta$ -polymorph		$\alpha$ -polymorph		$\beta$ -polymorph	
$2\theta$ ( $^\circ$ )	D ( $\text{\AA}$ )	$2\theta$ ( $^\circ$ )	d ( $\text{\AA}$ )	$2\theta$ ( $^\circ$ )	d ( $\text{\AA}$ )	$2\theta$ ( $^\circ$ )	d ( $\text{\AA}$ )	$2\theta$ ( $^\circ$ )	d ( $\text{\AA}$ )	$2\theta$ ( $^\circ$ )	d ( $\text{\AA}$ )	$2\theta$ ( $^\circ$ )	d ( $\text{\AA}$ )
11.44	7.73	11.84	7.47	11.38	7.77	11.33	7.81	11.78	7.51	11.33	7.81	11.89	7.44
14.42	6.14	12.98	6.82	14.40	6.15	14.32	6.18	12.96	6.83	14.34	6.17	13.00	6.81
19.28	4.60	13.80	6.41	19.24	4.61	19.20	4.62	13.75	6.44	19.23	4.61	13.80	6.41
22.92	3.88	17.14	5.17	22.86	3.89	22.77	3.90	17.06	5.19	22.90	3.88	17.13	5.17
26.18	3.40	19.30	4.60	26.20	3.40	26.12	3.41	19.26	4.61	26.11	3.41	19.32	4.59
30.38	2.94	24.10	3.69	30.38	2.94	30.36	2.94	24.06	3.70	30.37	2.94	24.17	3.68
		28.12	3.17					25.73	3.46			25.76	3.46
		29.46	3.03					29.29	3.05			29.42	3.03

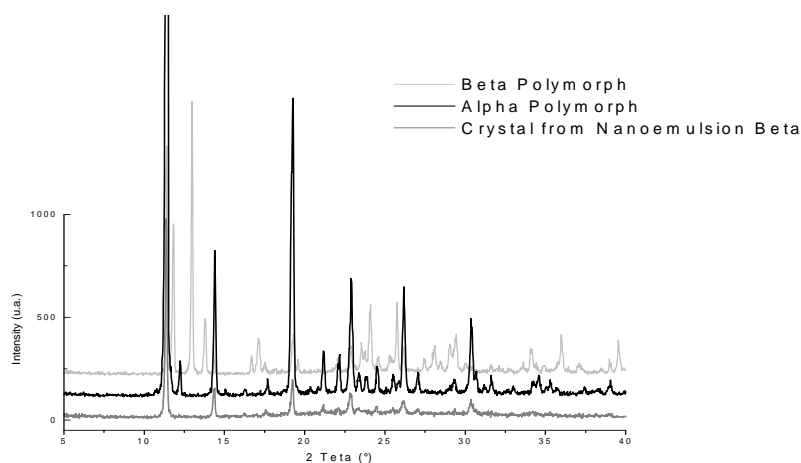


Fig. 4. XRD diffractograms of  $\beta$ -polymorph,  $\alpha$ -polymorph and nanoemulsion crystals.

The polymorphism of THD could influence its solubility in oils. THD solubility in soybean oil, castor oil, medium chain triglycerides (MCT), olive oil and a 1:1 castor oil:MCT mixture was evaluated. Excess amounts of THD ( $\alpha$  or  $\beta$ ) were added to each oil in sealed vials. The vials were kept under constant magnetic stirring at room temperature during 24 hours. The samples were

centrifuged at 15000 rpm for 120 min at 20 °C, an aliquot of each supernatant was diluted and THD content was assayed by HPLC (Araújo et al, Submitted for publication b).

As one can observe in Figure 5, no significant differences were observed between the solubility of the two polymorphic forms in all tested oils. Therefore, the polymorphic form used does not influence THD solubilization in the nanoemulsion internal phase.

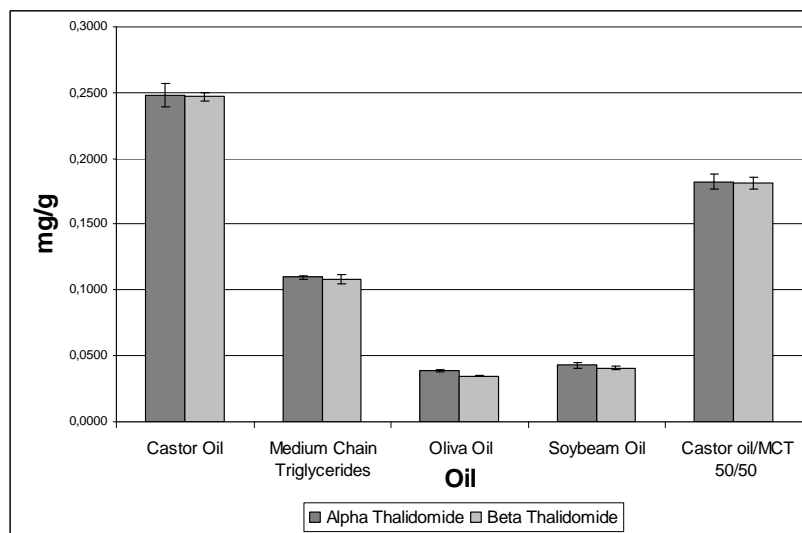


Fig. 5. THD polymorphs solubility in oils. \*significantly different (ANOVA, Tukey test,  $p \leq 0.05$ ).

Drug crystals collected from the THD formulation presented a crystalline structure which corresponds to that of  $\alpha$ -polymorph, differently from the raw material originally used. As discussed in the previous article (Araujo et al., Submitted for publication a), THD presents low solubility in oils, but this characteristic is not influenced by THD polymorphism, as we showed in this study. In order to investigate whether THD polymorphism could influence the nanoemulsion stability, a formulation was prepared using  $\alpha$ -polymorphic form (0.05 %). The crystallization process was also observed and the collected crystals were characterized by optical microscopy and FTIR. RXD was not performed due to the small amount of crystals. The crystals were characterized as  $\alpha$ -polymorph as well (data not shown). Further studies are necessary to determine whether the aqueous media is a

favorable environment for THD crystallization as  $\alpha$ -form or somehow the mechanism of crystal growth is influenced by the structure of the emulsion (Kogan et al., 2008).

### **Acknowledgements**

The authors thank CNPq/Brazil and CAPES/Brazil and for financial support and research fellowship, and to Prof. Tiana Tasca for optical microscope images.

### **References**

Araújo, F.A., Finatto, R.B., Kelmann, R.G., Teixeira, H.F., Koester, L.S. Submitted for publication a. Development and characterization of parenteral nanoemulsions containing thalidomide prepared by spontaneous emulsification method, *International Journal of Pharmaceutics*.

Araújo, F. A., Finatto, R. B., Ferronato, K., Oliveira, L. K., Kelmann, R. G., Teixeira, H. F., Koester, L. S. Submitted for publication b. A simple and rapid HPLC method for the determination of Thalidomide in parenteral nanoemulsions, *Analytical Letters*.

Allen, F.H., Trotter, J., 1970. Crystal and molecular structure of thalidomide. *Journal of the Chemical Society D: Chemical Communications*, 778-779.

Brittain, H.G., 2009. Polymorphism and solvatomorphism 2007. *J Pharm Sci* 98, 1617-1642.

Caira, M.R., Botha, S.A., Flanagan, D.R., 1994. Polymorphism of N-(2,6-dioxo-3-piperidyl)phthalimide (thalidomide): Structural characterization of a second monoclinic racemic modification. *Journal of Chemical Crystallography* 24, 95-99.

Carini, J.P., Pavei, C., Silva, A.P., Machado, G., Mexias, A.S., Pereira, V.P., Fialho, S.L., Mayorga, P., 2009. Solid state evaluation of some thalidomide raw materials. *Int J Pharm* 372, 17-23.

Kogan, A., Popov, I., Uvarov, V., Cohen, S., Aserin, A., Garti, N. 2008. Crystallization of carbamazepine pseudopolymorphs from nonionic microemulsions. *Langmuir* 24, 722-733.

Lara-Ochoa, F., Pérez, G.E., Mijangos-Santiago, F., 2007. Calorimetric determinations and theoretical calculations of polymorphs of thalidomide. *Journal of Molecular Structure* 840, 97-106.

Purohit, R., Venugopalan, P., 2009. Polymorphism: An overview. *Resonance* 14, 882-893.

Reepmeyer, J.C., Rhodes, M.O., Cox, D.C., Silverton, J.V., 1994. Characterization and crystal structure of two polymorphic forms of racemic thalidomide. *Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 2*, 2063-2067.

Yu, W., Tabosa do Egito, E.S., Barratt, G., Fessi, H., Devissaguet, J.P., Puisieux, F., 1993. A novel approach to the preparation of injectable emulsions by a spontaneous emulsification process. *International Journal of Pharmaceutics* 89, 139-146.





## DISCUSSÃO DOS RESULTADOS

---



Desde 1957, quando introduzida no mercado farmacêutico alemão e mundial, a talidomida vem demonstrando diferentes aplicações devido à heterogeneidade de mecanismos de ação até então já propostos mas, em contrapartida, demonstrou como uma substância de baixa toxicidade aparente pode desencadear efeitos tão devastadores como a teratogênese. As primeiras evidências positivas para sua utilização após sua proscrição aconteceram em 1965 quando Jacob Sheskin descobriu a eficácia da talidomida no tratamento da Hanseníase.

Somente em 1997 a utilização oficial de talidomida foi aprovada pelo FDA (Zeldis et al., 1999; FDA, 2009). Atualmente, a talidomida é aprovada para o tratamento do eritema nodoso leprótico, no controle e prevenção de úlceras aftóides idiopáticas nos pacientes portadores de HIV/AIDS, bem como no tratamento de algumas doenças crônico-degenerativas, tais como lúpus eritematoso e reação enxerto versus hospedeiro (REVH) (BRASIL, 2000).

A utilização de talidomida ainda se restringe à administração oral, mas sabe-se que em alguns casos, como REVH ou outras que comprometem tanto a deglutição como a absorção, a via parenteral seria a mais adequada (Schmidt et al., 1996; Jacobson et al., 1999; Eriksson et al., 2001; Teo et al., 2004; Vogelsang and Higman, 2004).

Diante disso e, principalmente, da instabilidade da molécula em meio aquoso, sugeriu-se neste trabalho o desenvolvimento de uma forma farmacêutica nanoemulsionada para administração parenteral de talidomida, utilizando a técnica de emulsificação espontânea.

Para análise das formulações e avaliação da estabilidade foi proposto o desenvolvimento de um novo método de quantificação da talidomida, pois não foi possível utilizar o método da farmacopéia americana (USP, 2008) devido às interferências dos componentes do sistema emulsionado. A validação do método foi conduzida de forma a cumprir todos os requisitos regulatórios (ICH, 2005) para doseamento do fármaco tanto nas formulações como nos óleos que possivelmente seriam utilizados no estudo. A robustez foi avaliada através de delineamento experimental de Plackett-burman testando 3 variáveis: pH da fase móvel, percentual de acetonitrila na fase móvel e comprimento de

onda. O método mostrou-se específico, linear ( $r^2 > 0,9998$ ), preciso (DPR % < 1,33%), exato (recuperação variou de 99,6 a 100,3 %) e robusto.

Através do ensaio de solubilidade da talidomida em óleos foi definido o óleo de rícino como núcleo oleoso para a nanoemulsão ( $\approx 0.260$  mg/g). A talidomida se mostrou muito pouco solúvel no óleo de rícino e TCM, e praticamente insolúvel em óleo de soja e oliva.

O estudo de desenvolvimento das formulações foi realizado a partir de uma formulação básica composta de óleo de rícino em concentração de 10 % (p/p) e tensoativo lipofílico lecitina de soja numa concentração de 3 % (p/p), concentração escolhida com base em estudos prévios de formulação e dados da literatura (Shi et al., 2009; Jang et al., 2009; Kelmann et al., 2007). Ainda, na fase aquosa, como agente isotonzante, foi empregada a glicerina em concentração de 2,5 % (p/p).

Na primeira fase do estudo foram testadas diferentes concentrações de talidomida (0,01, 0,015, 0,02 e 0,05 %, p/p) com o objetivo de definir a dose a ser incorporada. A partir dos resultados de diâmetro de gotícula, potencial zeta, polidispersidade e o estudo de estabilidade (amostras armazenadas a 4°C), concluiu-se que as concentrações mais estáveis foram as de 0,01 e 0,015 %, sendo 0,01 % mais estável no período de 45 dias. O decaimento de teor observado no 60º dia foi estatisticamente significativo ( $p \leq 0.05$ ) e isto conduziu o estudo para uma segunda fase, de otimização da formulação.

Nesta segunda fase foi avaliada a incorporação de diferentes concentrações de tensoativo hidrofílico não-iônico, polissorbato 80 (0,5, 1,0, 2,0 e 4,0 %, p/p) adicionadas na fase aquosa. As formulações com 0,5% de polissorbato mantiveram-se estáveis durante o período observado (60 dias). Nas concentrações mais elevadas (1,0, 2,0 e 4,0 %), foi observada uma diminuição do teor significativa já no 45º dia ( $p \leq 0.05$ ), este fenômeno de instabilidade pode ser explicado por uma possível reorganização do sistema e possível formação de micelas na fase externa. Este fenômeno poderia aumentar a transferência do fármaco para a fase aquosa, promovendo uma supersaturação e consequente nucleação e cristalização (Weiss, 2000; Han et al., 2004; Meldrum and Colfen, 2008, Giffard et al., 2009).

Importante salientar que todas as formulações demonstraram parâmetros com valores compatíveis com um sistema para administração parenteral, quais sejam: diâmetro de gotícula em torno de 200 nm, conteúdo de talidomida em torno de 95 %, potencial zeta em torno de -30 mV e índice de polidispersidade em torno de 0,200.

A partir desta investigação concluiu-se que a melhor formulação foi a constituída de uma fase oleosa com de 10 % (p/p) de óleo de rícino, 3 % (p/p) de lecitina de soja, 0,01 % (p/p) de talidomida e uma fase aquosa com 2,5 % (p/p) de glicerina e 0,5 % (p/p) de polissorbato 80. Os estudos de microscopia eletrônica de transmissão confirmaram o formato micelar quase esférico característico e o tamanho de gotícula nanométrico, corroborando com os resultados obtidos por espectroscopia de correlação de fótons.

O ensaio de liberação *in vitro* demonstrou através do método de diálise reversa que a talidomida em nanoemulsão é liberada a partir de um processo de difusão, sem diferenças significativas quando comparado ao fármaco solubilizado no meio doador. A liberação foi de cerca de 95 % em 4 horas.

As formulações que haviam sido preparadas com concentrações mais elevadas de talidomida (0,02 e 0,05 %), na primeira fase do estudo de formulação, apresentaram um decaimento drástico nos teores de fármaco. Nas embalagens foi constatado um resíduo cristalino. Análises deste resíduo utilizando microscopia ótica revelaram um hábito cristalino diferente da matéria-prima utilizada na preparação das nanoemulsões. Na tentativa de elucidar este fenômeno de recristalização e avaliar a possibilidade de transição polimórfica, realizou-se um estudo mais aprofundado de caracterização desses cristais através das técnicas de calorimetria exploratória diferencial, infravermelho e difração de raios-X.

Os resultados obtidos principalmente por difração de raios-X e infravermelho confirmaram que as amostras analisadas podiam ser caracterizadas como o polimorfo alfa da talidomida, diferente do polimorfo inicialmente utilizado para o preparo das formulações (beta).

A análise da solubilidade em óleos das formas alfa e beta da talidomida indicou que esta característica não é influenciada pelo polimorfismo. A preparação de formulação com o polimorfo alfa resultou igualmente no aparecimento de precipitados cristalinos caracterizados como forma alfa. Estes resultados sugerem que ambas as formas polimórficas podem ser empregadas na preparação das nanoemulsões.

## CONCLUSÕES

---





- O método cromatográfico desenvolvido mostrou-se específico, linear, preciso, exato e robusto;
- Dentre os óleos testados, o óleo de rícino foi o que mais solubilizou a talidomida (em torno de 0,260 mg/g), tendo sido escolhido para a composição da fase oleosa da formulação;
- Estudos de otimização da concentração de fármaco passível de incorporação nas nanoemulsões e da concentração de tensoativo hidrofílico demonstraram que a formulação mais estável é a composta por 0,01 % (p/p) talidomida e 0,5 % (p/p) de polissorbato 80;
- A elevação da concentração de polissorbato 80 ocasionou efeito negativo sobre a estabilidade das nanoemulsões no que se refere ao teor de fármaco;
- Os cristais coletados das formulações foram caracterizados como alfa-talidomida, demonstrando transição polimórfica em relação à matéria-prima utilizada (forma beta);
- Os ensaios de solubilidade em óleos com as duas formas polimórficas indicaram que para o preparo de nanoemulsões ambos polimorfos podem ser utilizados;
- A formulação mais promissora é constituída de uma fase oleosa com de 10 % (p/p) de óleo de rícino, 3 % (p/p) de lecitina de soja, 0,01 % (p/p) de talidomida, e de uma fase aquosa com 2,5 % (p/p) de glicerina e 0,5 % (p/p) de polissorbato 80. Esta permaneceu estável durante todo período avaliado.



## REFERÊNCIAS

---



## Referências

ABPST, Associação Brasileira de Portadores da Síndrome da talidomida. O que é Talidomida. Disponível em: <<http://www.talidomida.org.br/oque.asp>>. Acesso em: 26 de out. 2009.

ALMEIDA, M.E.; TEIXEIRA, H.F.; KOESTER, L.S. Preparação de emulsões submicrométricas: Aspectos teóricos sobre os métodos empregados na atualidade **Latin American Journal of Pharmacy**, v.27, n.5, p. 780-788, 2008.

ANDERSON, K.C. Lenalidomide and Thalidomide: Mechanisms of action - Similarities and differences. **Seminars in Hematology**, v. 42 .n. 4, p. S3-S8, 2005.

ASTRAZENECA DO BRASIL LTDA. **Bulas**. Disponível em <[http://www.astrazeneca.com.br/azws006/upload/home/bulas/Diprivan\\_1e2.pdf](http://www.astrazeneca.com.br/azws006/upload/home/bulas/Diprivan_1e2.pdf)>. Acesso em: 13 de nov.2009.

ATRA, E.; SATO, E.I. Treatment of the cutaneous lesions of systemic lupus erythematosus with thalidomide. **Clinical and Experimental Rheumatology**, v.11, n.5, p. 487-493,1993.

AVANTI POLAR LIPIDS. **Lipid Products**. Disponível em:<[http://avantilipids.com/index.php?option=com\\_content&view=article&id=100&Itemid=108](http://avantilipids.com/index.php?option=com_content&view=article&id=100&Itemid=108)>. Acesso em 20 de jan. 2010.

AVGERINOU, G. Treatment of cutaneous lupus erythematosus. **Epitheorese Klinikes Farmakologias kai Farmakokinetikes**, v.8, n. 4, p.224-231, 1990.

B. BRAUN MELSUNGEN AG. **Product-Overview**. Disponível em:<<http://www.bbraun.com/cps/rde/xchg/bbraun-com/hs.xsl/products.html?>>. Acesso em 13 de nov.09.

BACH, A.C.; BABAYAN, V.K. Medium-chain triglycerides: An update. **American Journal of Clinical Nutrition**, v.36, n.5, p. 950-962, 1982.

BATRAKOVA, E.; LEE, S.; LI, S.; VENNE, A.; ALAKHOV, V.; KABANOV, A. Fundamental relationships between the composition of pluronic block copolymers and their hypersensitization effect in MDR cancer cells **Pharmaceutical Research**, v.16 n.9, p. 1373-1379, 1999.

BEARE-ROGERS, J.; DIEFFENBACHER, A.; Holm, J.V. Lexicon of lipid nutrition. **Pure and Applied Chemistry**, v.73, n.4, p. 685-744, 2001.

BENITA, S.; LEVY, M.Y. Submicron emulsions as colloidal drug carriers for intravenous administration: Comprehensive physicochemical characterization. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v.82, n. 11, p. 1069-1079, 1993.

BENITA, S. Introduction and overview. In: Benita, S. (Ed.), **Submicron Emulsion in Drug Targeting & Delivery**. Harwood Academic, The Netherlands, p. 1–5, 1998.

BORGES, L.G; FROEHLICH, P.E. Talidomida: novas perspectivas para utilização como antiinflamatório, imunossupressor e antiangiogênico. **Rev. Assoc. Med. Bras.**, v. 49, n. 1, 2003.

Bouchemal, K.; Briançon, S.; Perrier, E.; Fessi, H. Nano-emulsion formulation using spontaneous emulsification: solvent, oil and surfactant optimization. **Int. J. Pharm.** 280, 241–251, 2004.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Portaria nº 354**, 15 de agosto de 1997. Disponível em <<http://e-legis.anvisa.gov.br/leisref/public/showAct.php?id=7173&word=>>>. Acesso em 20 de jun. 2008.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Lei nº 10651**, 16 de abril de 2003. Disponível em <<http://e-legis.anvisa.gov.br/leisref/public/showAct.php?id=20985&word=>>>. Acesso em 20 de jun. 2008.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Portaria nº 344**, 12 de maio de 1998. Disponível em <<http://e-legis.anvisa.gov.br/leisref/public/showAct.php?id=20054&word=>>>. Acesso em 20 de jun. 2008.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Resolução - RDC nº 34**, 20 de abril de 2000. Disponível em <[http://e-legis.anvisa.gov.br/leisref/public/showAct.php?id=9482&word=mieloma m%C3%BAtiplo>](http://e-legis.anvisa.gov.br/leisref/public/showAct.php?id=9482&word=mieloma%20m%C3%BAtiplo>)>. Acesso em 20 de jun. 2008.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos. Departamento de Assistência Farmacêutica e Insumos Estratégicos. **Relação Nacional de Medicamentos Essenciais : RENAME**. 5. ed. Brasília , DF, 2007.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Políticas de Saúde. Departamento de Atenção Básica. Gerência Técnica de Assistência Farmacêutica. **Relação Nacional de Medicamentos Essenciais RENAME**. 3. ed. Brasília: DF, 2002.

BRAUN, A.G.; EMERSON, D.J.; NICHINSON, B.B. Teratogenic drugs inhibit tumour cell attachment to lectin-coated surfaces. **Nature**, v.282 n.5738, p. 507-509, 1979

CAIRA, M.R.; BOTHA, S.A.; FLANAGAN, D.R. Polymorphism of N-(2,6-dioxo-3-piperidyl)phthalimide (thalidomide): Structural characterization of a second monoclinic racemic modification. **Journal of Chemical Crystallography**, v.24 n.1, p. 95-99,1994.

CALDER, P.C. Rationale for using new lipid emulsions in parenteral nutrition and a review of the trials performed in adults. **Proceedings of the Nutrition Society**, p. 1-9, 2009.

CALDER, P.C. Use of fish oil in parenteral nutrition: Rationale and reality. **Proceedings of the Nutrition Society**, v.65, p.3, p. 264-277,2006.

CALDER, P.C.; SHERRINGTON, E.J.; ASKANAZI, J.; NEWSHOLME, E.A. Inhibition of lymphocyte proliferation in vitro by two lipid emulsions with different fatty acid compositions. **Clinical Nutrition**, v.13 n.2, p. 69-74,1994.

CARINI, J. P. **Avaliação das propriedades físico-químicas da matéria-prima talidomida com ênfase no polimorfismo e sua influência frente à dissolução e compactação**, 2007 192f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas). Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, 2007.

CELGENE CORPORATION. **Thalomid<sup>®</sup> (thalidomide) full prescribing information**. Disponível em: <[http://www.thalomid.com/pdf/Thalomid\\_PI.pdf](http://www.thalomid.com/pdf/Thalomid_PI.pdf)>. Acesso em 20 de jun. 2008.

CHAO, T.C.; CHU, Z.; TSENG, L.M.; CHIOU, T.J.; HSIEH, R.K.; WANG, W.S.; YEN, C.C.; YANG, M.H.; HSIAO, LT.; LIU, J.H.; CHEN, P.M. Paclitaxel in a novel formulation containing less Cremophor EL as first-line therapy for advanced breast cancer: A phase II trial. **Investigational New Drugs**, v.23, n.2, p. 171-177, 2005.

CONSTANTINIDES, P.P.; CHAUBAL, M.V.; SHORR, R. Advances in lipid nanodispersions for parenteral drug delivery and targeting. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v.60, n. 6, p. 757-767, 2008.

COX, E.H.; KNIBBE, C.A.J.; KOSTER, V.S.; LANGEMEIJER, M.W.E.; TUKKER, E.E.; LANGE, R.; KUKS, P.F.M.; LANGEMEIJER, H.J.M.; LIE-A-HUEN, L.; DANHOF, M. Influence of different fat emulsion-based intravenous formulations on the pharmacokinetics and pharmacodynamics of propofol. **Pharmaceutical Research**, v.15, n.3, p. 442-448, 1998.

D'AMATO, R.J.; LOUGHNAN, M.S.; FLYNN, E.; FOLKMAN, J. Thalidomide is an inhibitor of angiogenesis. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 91, n.9, p. 4082-4085, 1994.

DAVIES, F.E.; RAJE, N.; HIDESHIMA, T.; LENTZSCH, S.; YOUNG, G.; TAI, Y.-T.; LIN, B.; PODAR, K.; GUPTA, D.; CHAUHAN, D.; TREON, S.P.; RICHARDSON, P.G.; SCHLOSSMAN, R.L.; MORGAN, G.J.; MULLER, G.W.; STIRLING, D.I.; ANDERSON, K.C. Thalidomide and immunomodulatory derivatives augment natural killer cell cytotoxicity in multiple myeloma, **Blood**, v.98, n.1, p. 210-216, 2001.

DIMOPOULOS, M.A.; ZERVAS, K.; KOUVATSEAS, G.; GALANI, E.; GRIGORAKI, V.; KIAMOURIS, CH.; VERVESSOU, E.; SAMANTAS, E.; PAPADIMITRIOU, CH.; ECONOMOU, O.; GIKA, D.; PANAYIOTIDIS, P.; CHRISTAKIS, I.; ANAGNOSTOPOULOS, N. Thalidomide and dexamethasone combination for refractory multiple myeloma. **Annals of Oncology** v.12, n. 7, p. 991-995, 2001.

DORNBOS, D.L.; MULLEN, R.E.; HAMMOND, E.G. Phospholipids of environmentally stressed soybean seeds. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v.66, n.9, p. 1371-1373, 1989.

DRISCOLL, D.F.; LING, P.R.; BISTRAN, B.R. Pharmacopeial compliance of fish oil-containing parenteral lipid emulsion mixtures: Globule size distribution (GSD) and fatty acid analyses. **International Journal of Pharmaceutics**, v.379, n.1-2, p. 125-130, 2009.

DROBECK, H.P.; COULSTON, F.; CORNELIUS, D. Effects of thalidomide on fetal development in rabbits and on establishment of pregnancy in monkeys. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v.7, n.2, p. 165-178, 1965.



DUPONT, I.E. Peroxidation of lipid emulsions: Effects of changes in fatty acid pattern and  $\alpha$ -tocopherol content on the sensitivity to peroxidative damage **Clinical Nutrition**, v.18, n.2, p.113-116, 1999.

ECCLESTON, G.M. Emulsions . In: Swarbrick J., and Boylan J.C. (Eds), **Encyclopedia of Pharmaceutical Technology**. Marcel Dekker Inc., 2007 p.1548-1565.

EHRlich, G.E. Behcet's disease: Current concepts. **Comprehensive Therapy**, v.15, p.1, p. 27-30, 1989.

ERIKSSON, T.; BJÖRKMAN, S.; HÖGLUND, P. Clinical pharmacology of thalidomide. **European Journal of Clinical Pharmacology**, v.57, n.5, p. 365-376, 2001.

ERIKSSON, T.; BJÖRKMAN, S.; ROTH, B.; FYGE, A.; HÖGLUND, P. Enantiomers of thalidomide: Blood distribution and the influence of serum albumin on chiral inversion and hydrolysis. **Chirality**, v.10, n.3, p. 223-228, 1998.

ERIKSSON, T.; WALLIN, R.; HÖGLUND, P.; ROTH, B.; QI, Z.; ÖSTRAAT, O.; BJÖRKMAN, S. Low bioavailability of rectally administered thalidomide. **American Journal of Health-System Pharmacy**, v.57, n.17, p. 1607-1610, 2000.

FAVER, I.R.; GUERRA, S.G.; SU, W.P.D.; EL-AZHARY, R. Thalidomide for dermatology: A review of clinical uses and adverse effects. **International Journal of Dermatology**, v.44, n.1, p. 61-67, 2005.

**FDA**. U.S. Food and Drug administration. Center of Drug Evaluation and Research, Rockville, 1998. Disponível em <<http://www.fda.gov/Safety/SafetyofSpecificProducts/ucm180604.htm> >. Acesso em 20.06.2009.

**FDA**. U.S. Food and Drug administration. Center of Drug Evaluation and Research, Rockville, 2009. Disponível em <<http://www.accessdata.fda.gov/scripts/cder/iig/index.cfm> >. Acesso em 16.11.2009.

FIELD, E.O.; GIBBS, J.E.; TUCKER, D.F.; HELLMANN, K. Effect of thalidomide on the graft versus host reaction, **Nature**, v. 211, n.5055, p.1308-1310, 1966.

FLOURY, J.; LEGRAND, J.; DESRUMAUX, A. Analysis of a new type of high pressure homogeniser. Part B. study of droplet break-up and recoalescence phenomena **Chemical Engineering Science**, v.59, n.6, p. 1285-1294, 2004.

FLOYD, A.G. Top ten considerations in the development of parenteral emulsions, **Pharmaceutical Science and Technology Today**, v.2, n.4, p.134-143, 1999.

FORGIARINI, A.; ESQUENA, J.; GONZÁLEZ, C.; SOLANS, C. Formation of nano-emulsions by low-energy emulsification methods at constant temperature, **Langmuir**, v.17, n.7, p. 2076-2083, 2001.

FRANKEL, E.N.; SATUÉ-GRACIA, T.; MEYER, A.S.; GERMAN, J.B. Oxidative stability of fish and algae oils containing long-chain polyunsaturated fatty acids in bulk and in oil-in-water emulsions, **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.50, n. 7, p. 2094-2099, 2002.

Franks, M.E.; Macpherson, G.R.; Figg, W.D. Thalidomide. **Lancet**, v. 363, n. 9423, p. 1802-1811, 2004.

FRATTA, I.D.; SIGG, E.B.; MAIORANA, K. Teratogenic effects of thalidomide in rabbits, rats, hamsters, and mice, **Toxicology and Applied Pharmacology**, v.7 n.2, p. 268-286, 1965.

FU, L.M.; FU-LIU, C.S. Thalidomide and tuberculosis, **International Journal of Tuberculosis and Lung Disease**, v.6, n.7, p. 569-572, 2002.

FUNDAÇÃO EZEQUIEL DIAS (FUNED). **Bula: Talidomida**. Disponível em <[http://www.funed.mg.gov.br/produtos\\_servicos/medicamentos/bulas/pdf/Bula-FUNED%20Talidomida-pdf.pdf](http://www.funed.mg.gov.br/produtos_servicos/medicamentos/bulas/pdf/Bula-FUNED%20Talidomida-pdf.pdf)>. Acesso em 20.de jun.2008.

GAIKWAD, S.G.; PANDIT, A.B. Ultrasound emulsification: Effect of ultrasonic and physicochemical properties on dispersed phase volume and droplet size **Ultrasonics Sonochemistry**, v.15, n.4, p. 554-563, 2008.

GAO, K., SUN, J., LIU, K., LIU, X., HE, Z. Preparation and characterization of a submicron lipid emulsion of docetaxel: Submicron lipid emulsion of docetaxel. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, v. 34, n. 11, p. 1227-1237, 2008.

GATTI, C.F.; AZCUNE, R.; PORTA, J.; PERISSE, B. Lupus eritematoso tumidus.

Tratamiento con talidomida, **Revista Argentina de Dermatologia**, v. 67, n.1, p. 50-53, 1986.

GELDERBLOM, H.; VERWEIJ, J.; NOOTER, K.; SPARREBOOM, A. Cremophor EL: The drawbacks and advantages of vehicle selection for drug formulation, **European Journal of Cancer**, v.37, n.13, p. 1590-1598, 2001.

GOOSEN, C.; LAING, T.J.; PLESSIS, J.D.; GOOSEN, T.C.; FLYNN, G.L.

Physicochemical characterization and solubility analysis of thalidomide and its N-alkyl analogs. **Pharmaceutical Research**, v.19, n. 1, p. 13-19, 2002.

GRINSPAN, D.; FERNANDEZ BLANCO, G.; AGUERO, S. Treatment of aphthae with thalidomide , **Journal of the American Academy of Dermatology**, v.20, n.6, p.1060-1063, 1989.

GRÜNENTHAL GMBH. **Thalidomide chronology**. Disponível em

<[http://www.contergan.grunenthal.info/ctg/en\\_EN/html/ctg\\_en\\_en\\_history.jhtml?CatId=ctg\\_en\\_en\\_history\\_a\\_08](http://www.contergan.grunenthal.info/ctg/en_EN/html/ctg_en_en_history.jhtml?CatId=ctg_en_en_history_a_08)>. Acesso em: 20 de jan.2010.

GUTIERREZ-RODRIGUEZ, O.; STARUSTA-BACAL, P.; GUTIERREZ-MONTES, O. Treatment of refractory rheumatoid arthritis - the thalidomide experience, **Journal of Rheumatology**, v.16, n.2, p. 158-163, 1989.

HAAS, P. S.; DENZ, U.; IHORST, G.; ENGELHARDT, M. Thalidomide in consecutive multiple myeloma patients: single-center analysis on practical aspects, efficacy, side effects and prognostic factors with lower thalidomide doses, **European Journal of Haematology**, v. 80, n. 4, p.303-309, 2008.

HAMMAD, M.A.; MULLER, B.W. Solubility and stability of tetrazepam in mixed micelles, **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v.7, n.1, p. 49-55, 1998.

HAMZA 'H, M. Treatment of Behcet's disease with thalidomide, **Clinical Rheumatology**, v. 5, n.3, p. 365-371, 1986.

HAN, J.; DAVIS, S.S.; PAPANDREOU, C.; MELIA, C.D.; WASHINGTON, C. Design and evaluation of an emulsion vehicle for paclitaxel. I. Physicochemical properties and plasma stability, **Pharmaceutical Research**, v. 21, n.9, p. 1573-1580, 2004.

HARGREAVES, M.K.; PRITCHARD, J.G.; DAVE, H.R. Cyclic carboxylic monoimides, **Chemical Reviews**, v.70, n. 4, p. 439-469,1970.

HASKELL, R.J. Characterization of submicron systems via optical methods, **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v.87, p.2, p. 125-129, 1998.

HE, L.; WANG, G.L.; ZHANG, Q. An alternative paclitaxel microemulsion formulation: Hypersensitivity evaluation and pharmacokinetic profile, **International Journal of Pharmaceutics**, v.250, n.1, p. 45-50, 2003.

HENDLER, S.S.; MCCARTY, M.F. Thalidomide for autoimmune disease, **Medical Hypotheses**, v.10, n.4, p. 437-443,1983.

HENEY, D.; BAILEY, C.C.; LEWIS, I.J. Thalidomide in the treatment of graft-versus-host disease, **Biomedicine and Pharmacotherapy**, v.44, n. 4, p.199-204, 1990.

HENEY, D.; NORFOLK, D.R.; WHEELDON, J.; BAILEY, C.C.; LEWIS, I.J.; BARNARD, D.L. Thalidomide treatment for chronic graft-versus-host disease, **British Journal of Hematology**, v.78, n. 1, p. 23-27, 1991.

HENRY, J.V.L.; FRYER, P.J.; FRITH, W.J.; NORTON, I.T. The influence of phospholipids and food proteins on the size and stability of model sub-micron emulsions, **Food Hydrocolloids**, v.24, n.1, p. 66-71, 2010.

HÖGLUND, P.; ERIKSSON, T.; BJORKMAN, S. A double-blind study of the sedative effects of the thalidomide enantiomers in humans. **Journal of Pharmacokinetics and Biopharmaceutics**, v.26, p.4, p. 363-383,1998.

HOUSMAN, T.S.; JORIZZO, J.L.; MCCARTY, M.A.; GRUMMER, S.E.; FLEISCHER JR, A.B.; SUTEJ, P.G. Low-dose thalidomide therapy for refractory cutaneous lesions of lupus erythematosus. **Archives of Dermatology**, v.139, n. 1, p. 50-54, 2003.

IGARASHI, R.; TAKENAGA, M.; TAKEUCHI, J.; KITAGAWA, A.; MATSUMOTO, K.; MIZUSHIMA, Y. Marked hypotensive and blood flow-increasing effects of a new lipo-PGE1 (lipo-AS013) due to vascular wall targeting, **Journal of Controlled Release**, v.71, n.2, p. 157-164, 2001.

INTERNATIONAL CONFERENCE ON HARMONIZATION (ICH). **Guideline on the Validation of analytical procedures**: Text and Methodology Q2(R1), 2005.

INVERNIZZI, R.; TRAVAGLINO, E.; DE AMICI, M.; BRUGNATELLI, S.; RAMAJOLI, I.; ROVATI, B.; BENATTI, C.; ASCARI, E. Thalidomide treatment reduces apoptosis levels in bone marrow cells from patients with myelodysplastic syndromes, **Leukemia Research**, v.29, n.6, p. 641-647,2005.

JACOBSON, J.M.; GREENSPAN, J.S.; SPRITZLER, J.; KETTER, N.; FAHEY, J.L.; BROOKS JACKSON, J.; FOX, L.; CHERNOFF, M.; WU, W.W.A.; MACPHAIL, L.A.; VASQUEZ, G.J.; WOHL, D.A. Thalidomide for the treatment of esophageal aphthous ulcers in patients with human immunodeficiency virus infection. **New England Journal of Medicine**, v. 336, n. 21, p. 1487-1493, 1999.

JALALI-HERAVI, M.; VOSOUGH, M. Characterization and determination of fatty acids in fish oil using gas chromatography-mass spectrometry coupled with chemometric resolution techniques, **Journal of Chromatography A**, v.1024, n.1-2, p. 165-176, 2004.

JIN, S.H.; KIM, T.I.; YANG, K.M.; KIM, W.H. Thalidomide destabilizes cyclooxygenase-2 mRNA by inhibiting p38 mitogen-activated protein kinase and cytoplasmic shuttling of HuR, **European Journal of Pharmacology**, v.558, n.1-3, p. 14-20, 2007.

JUMAA, M.; MÜLLER, B.W. In vitro investigation of the effect of various isotonic substances in parenteral emulsions on human erythrocytes. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v.9, n. 2, p.207–212, 1999.

JUMAA, M.; MÜLLER, B.W. Physicochemical properties of chitosan-lipid emulsions and their stability during the autoclaving process, **International Journal of Pharmaceutics**, v.183, n. 2, p. 175-184, 1999.

JUMAA, M.; MÜLLER, B.W. The stabilization of parenteral fat emulsion using non-ionic ABA copolymer surfactant, **International Journal of Pharmaceutics**, v.174, n.1-2, p. 29-37,1998.

KABANOV, A.V.; BATRAKOVA, E.V.; ALAKHOV, V.Y. Pluronic® block copolymers for overcoming drug resistance in cancer, **Advanced Drug Delivery Reviews**, v.54, n. 5, p. 759-779, 2002.

KARIM, M.Y.; RUIZ-IRASTORZA, G.; KHAMASHTA, M.A.; HUGHES, G.R.V. Update on therapy - Thalidomide in the treatment of lupus, **Lupus**, v.10, n. 3, p. 188-192, 2001.

KAWAMATA, A.; ITO, D.; ODANI, T.; ISOBE, T.; IWASE, M.; HATORI, M.; NAGUMO, M. Thalidomide suppresses melanoma growth by activating natural killer cells in mice.

**Oncology Reports**, v.16, n. 6, p. 1231-1236, 2006.

KEIFER, J.A.; GUTTRIDGE, D.C.; ASHBURNER, B.P.; BALDWIN JR., A.S. Inhibition of NF- $\kappa$ B Activity by Thalidomide through Suppression of I $\kappa$ B Kinase, **Activity Journal of Biological Chemistry**, v.276, n. 25, p. 22382-22387, 2001.

KELSEY, F. O. Thalidomide update: regulatory aspects. **Teratology**, v.38, p.221-226, 1988

KENYON, B.M.; BROWNE, F.; D'AMATO, R.J. Effects of thalidomide and related metabolites in a mouse corneal model of neovascularization, **Experimental Eye Research**, v. 64, n. 6, p. 971-978, 1997.

KERWIN, B.A. Polysorbates 20 and 80 used in the formulation of protein biotherapeutics: Structure and degradation pathways, **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v.97, n. 8, p. 2924-2935, 2008.

KLANG, S.; BENITA, S. Design and evaluation of submicron emulsions as colloidal drug carriers for intravenous administration. Submicron Emulsion. In: S. BENITA, **Drug Targeting & Delivery**, Harwood Academic Publishers, The Netherlands, 1998, p.119-152.

KRENN, M.; GAMCSIK, M.P.; VOGELSANG, G.B.; COLVIN, O.M.; LEONG, K.W. Improvements in solubility and stability of thalidomide upon complexation with hydroxypropyl- $\beta$ -cyclodextrin. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 81, n. 7, p. 685-689, 1992.

LARA-OCHOA, F.; PÉREZ, G.E.; MIJANGOS-SANTIAGO, F. Calorimetric determinations and theoretical calculations of polymorphs of thalidomide. **Journal of Molecular Structure**, v.840, n.1-3, p. 97-106, 2007.

LEAL-CALDERON, F. Emulsification In: LEAL-CALDERON F.; SCHMITT V.; BIBETTE J.E.O. **Emulsion Science Basic Principles**, Springer Science, New York, 2007, p. 5-51.

LENZ, W.; PFEIFFER, R.A.; KOSENOW, W.; HAYMAN, D.J. Thalidomide and congenital abnormalities, **The Lancet**, v.279, p. 45-46, 1962

LIEBERMAN, H.A.; RIEGER M. M.; BANKER G.S. **Pharmaceutical Dosage Forms: Disperse Systems**, 2 ed, v.2. Nova Iorque: Informa Healthcare, 2005, 547 p.

LIMA, L.M.; FRAGA, C.A.M.; BARREIRO, E.J. O renascimento de um fármaco: Talidomida **Quimica Nova**, v.24, n.5, p. 683-688, 2001.

LIPOID. **Product range**. Disponível em: <<http://www.lipoid.com/products/index.html>>. Acesso em 20 de out. 2009.

LOPEZ-MONTILLA, J.C.; HERRERA-MORALES, P.E.; PANDEY, S.; SHAH, D.O. Spontaneous emulsification: Mechanisms, physicochemical aspects, modeling, and applications, **Journal of Dispersion Science and Technology**, v.23, n.1-3, p. 219-268, 2002.

M. MALMSTEN. **Surfactants and Polymers in Drug Delivery**, Marcel Dekker, New York, 2002, 357 p.

MALVERN INSTRUMENTS LIMITED. Disponível em <[http://www.malvern.com/common/downloads/MRK500-02\\_L\\_R.pdf](http://www.malvern.com/common/downloads/MRK500-02_L_R.pdf)>. Acesso em 09 de set.2008.

MARTI-MESTRES, G.; NIELLOUD, F.; FORTUNÉ, R.; FERNANDEZ, C.; MAILLOLS, H. Effect of the addition of oxybenzone or octyl-methoxycinnamate on particle size of submicron emulsions, **Drug Development and Industrial Pharmacy**, v.26, n. 3, p. 349-356, 2000.

MASON, T.G.; GRAVES, S.M.; WILKING, J.N.; LIN, M.Y. Extreme emulsification: Formation and structure of nanoemulsions, **Condensed Matter Physics**, v.9, n. 1, p. 193-199, 2006b.

MASON, T.G.; WILKING, J.N.; MELESON, K.; CHANG, C.B.; GRAVES, S.M. Nanoemulsions: Formation, structure, and physical properties, **Journal of Physics Condensed Matter**, v.18, n. 41, art. no. R01, p. R635-R666, 2006a.

MATTHEWS, S.J.; MCCOY, C. Thalidomide: A review of approved and investigational uses. **Clinical Therapeutics**, v.25, n. 2, p. 342-395, 2003.

MCBRIDE, W.G. Thalidomide and congenital abnormalities, **The Lancet**, v. 278, n.7216, p. 1358, 1961.

MEINDERS, M.B.J.; VAN VLIET, T. The role of interfacial rheological properties on Ostwald ripening in emulsions, **Advances in Colloid and Interface Science**, v.108-109, p. 119-126, 2004.

MERISKO-LIVERSIDGE, E.; LIVERSIDGE, G.G.; COOPER, E. R. Nanosizing: A formulation approach for poorly-water-soluble compounds. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 18, p. 113-120, 2003.

MIZUSHIMA, Y.; TOYOTA, T.; OKITA, K.; OHTOMO, E. Recent clinical studies on lipo-PGE1 and lipo-PGI2: PGE1 and PGI2 incorporated in lipid microspheres for targeted delivery, **Journal of Controlled Release**, v.28, n.1-3, p. 243-249(1994).

MOGHIMI, S.M.; HUNTER, A.C.; DADSWELL, C.M.; SAVAY, S.; ALVING, C.R.; SZEBENI, J. Causative factors behind poloxamer 188 (Pluronic F68, Flocor™) induced complement activation in human sera. A protective role against poloxamer-mediated complement activation by elevated serum lipoprotein levels, **Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease**, v.1689, n. 2, p. 103-113, 2004.

MOREIRA, A.L.; SAMPAIO, E.P.; ZMUIDZINAS, A.; FRINDT, P.; SMITH, K.A.; KAPLAN, G. Thalidomide exerts its inhibitory action on tumor necrosis factor  $\alpha$  by enhancing mRNA degradation, **Journal of Experimental Medicine**, v.177, n. 6, p. 1675-1680, 1993.

MULLER, R.H.; JACOBS, C.; KAYSER, O. Nanosuspensions as particulate drug formulations in therapy: Rationale for development and what we can expect for the future, **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 47, p. 3-19, 2001.

National Cancer Institute. Cancer Therapy Evaluation Program. Disponível em <<http://ctep.cancer.gov/reporting/ctc.html>>. Acesso em 10 de janeiro de 2009.

NIKAS, D.N.; CHATZIATHANASIOU, G.; KOTSIA, A.; PAPAMICHAEL, N.; THOMAS, C.; PAPAFAKLIS, M.; NAKA, K.K.; KAZAKOS, N.; MILIONIS, H.J.; VAKALIS, K.; KATSOURAS, C.S.; MPOUMPA, V.; VOUGIOUKLAKIS, T.; MICHALIS, L. Effect of intravenous administration of antioxidants alone and in combination on myocardial reperfusion injury in an experimental pig model. **Current Therapeutic Research - Clinical and Experimental**, v. 69, n. (5), p. 423-439, 2008.

OGUNNIYI, D.S. Castor oil: A vital industrial raw material, **Bioresource Technology**, v.97, n. 9, p. 1086-1091, 2006.



OKAFOR, M.C. Thalidomide for erythema nodosum leprosum and other applications, **Pharmacotherapy**, v. 23, n. 4, p. 481-493, 2003.

OTT, G.; SINGH, M.; KAZAZ, J.; BRIONES, M.; SOENAWAN, E.; UGOZZOLI, M.; O'HAGAN, D.T. A cationic sub-micron emulsion (MF59/DOTAP) is an effective delivery system for DNA vaccines, *Journal of Controlled Release*, v. 79 n. 1-3, p. 1-5, 2002.

PALACIOS, L.E.; WANG, T. Egg-yolk lipid fractionation and lecithin characterization , **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v.82, n. 8, p. 571-578, 2005.

PARAVAR, T.; LEE, D.J. Thalidomide: Mechanisms of action, **International Reviews of Immunology**, v. 27, n. 3, p. 111-135, 2008.

PARKER, P.M.; CHAO, N.; NADEMANEE, A.; O'DONNELL, M.R.; SCHMIDT, G.M.; SNYDER, D.S.; STEIN, A.S.; SMITH, E.P.; MOLINA, A.; STEPAN, D.E.; KASHYAP, A.; PLANAS, I.; SPIELBERGER, R.; SOMLO, G.; MARGOLIN, K.; ZWINGENBERGER, K.; WILSMAN, K.; NEGRIN, R.S.; LONG, G.D. Thalidomide as salvage therapy for chronic graft-versus-host disease , **Blood**, v.86, n.9, p. 3604-3609,1995.

PENNA, G.O.; MACEDO, V.O.; MARTELLI, C.M.T.; MAROJA, M.D.F.; STEFANI, M.M.A.; CHAUL, A. Thalidomide in the treatment of erythema nodosum leprosum (ENL): Systematic review of clinical trials and prospects of new investigations **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v.80, n. 5, p. 511-522, 2005.

PINNAMANENI, S.; DAS, N.G.; DAS, S.K. Comparison of oil-in-water emulsions manufactured by microfluidization and homogenization, **Pharmazie**, v.58, n. 8, p. 554-558, 2003.

PISCITELLI, S.C.; FIGG, W.D.; HAHN, B.; KELLY, G.; THOMAS, S.; WALKER, R.E. Single-dose pharmacokinetics of thalidomide in human immunodeficiency virus-infected patients. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.41, n. 12, p. 2797-2799, 1997.

PITKANEN, O.M. Peroxidation of lipid emulsions: A hazard for the premature infant receiving parenteral nutrition?. **Free Radical Biology and Medicine**, v.13, n. 3, p. 239-245, 1992.

RANDALL, T. Thalidomide's back in the news, but in more favorable circumstances, **Journal of the American Medical Association**,v. 263, n. 11, p. 1467-1468, 1990.

RAVOT, E.; LISZIEWICZ, J.; LORI, F. New uses for old drugs in HIV infection. The role of hydroxyurea, cyclosporin and thalidomide, **Drugs**, v. 58, n. 6, p. 953-963, 1999.

REEPMEYER, J.C.; RHODES, M.O.; COX, D.C.; SILVERTON, J.V. Characterization and crystal structure of two polymorphic forms of racemic thalidomide. **Journal of the Chemical Society**, v.2, n.9, p. 2063-2067, 1994.

ROBIN, O.; REMILLARD, N.; PAQUIN, P. Influence of major process and formulation parameters On microfluidized fat globule size distribution and example of a practical consequences, **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v.80, n. 2-3, p. 211-222, 1993.

ROSSI, J.; LEROUX, J.C. Principles in the development of intravenous lipid emulsions. Role of Lipid Excipients in Modifying Oral and Parenteral Drug Delivery, p. 88-123, 2007.

ROWE, R.C.; SHESKEY, P.J.; OWEN S.C. (eds). **Pharmaceutical Excipients**. Pharmaceutical Press and American Pharmacists Association. Electronic version, 2006.

RXLIST DRUG INDEX. **Drug Description: Cleviprex**. Disponível em <[www.rxlist.com/cleviprex-drug.htm](http://www.rxlist.com/cleviprex-drug.htm)>. Acesso em 13 de nov. 2009a.

RXLIST DRUG INDEX. **Drug Description:: Diprovan**. Disponível em <<http://www.rxlist.com/diprovan-drug.htm>>. Acesso em 13 de nov. 2009b.

RXLIST DRUG INDEX. **Search Results: Lipid Emulsion**. Disponível em <[http://www.rxlist.com/script/main/srchcont\\_rxlist.asp?src=lipid+emulsion&cat=rx-desc](http://www.rxlist.com/script/main/srchcont_rxlist.asp?src=lipid+emulsion&cat=rx-desc)>. Acesso em 13 de nov. 2009c.

RXLIST DRUG INDEX. **Thalidomide**. Disponível em <<http://www.rxlist.com/cgi/generic/thalidom.htm>>. Acesso em 20 de jun.2008.

SADURNÍ, N.; SOLANS, C.; AZEMAR, N.; GARCÍA-CELMA, M.J. Studies on the formation of O/W nano-emulsions, by low-energy emulsification methods, suitable for pharmaceutical applications, **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v.26, n. 5, p. 438-445, 2005.

SAMPAIO, E.P.; SARNO, E.N.; GALILLY, R.; COHN, Z.A.; KAPLAN, G. Thalidomide selectively inhibits tumor necrosis factor  $\alpha$  production by stimulated human monocytes, **Journal of Experimental Medicine**, v.173, n. 3, p. 699-703, 1991.

- SCHEFFLER, M.; COLBURN, W.; KOOK, K.; THOMAS, S.D. Thalidomide does not alter estrogen-progesterone hormone single-dose pharmacokinetics, **Clinical Pharmacology & Therapeutics**, v.65, p.483-90, 2000.
- SCHMIDT, H.; RUSH, B.; SIMONIAN, G.; MURPHY, T.; HSIEH, J.; CONDON, M. Thalidomide inhibits TNF response and increases survival following endotoxin injection in rats. **Journal of Surgical Research**, v.63, n.1, p. 143-146, 1996.
- SCHOLFIELD, C.R. Composition of soybean lecithin, **Journal of the American Oil Chemists Society**, v.58, n.10, p. 889-892, 1981.
- Schott, H. Dispersiones Coloidales. In: GENNARO, A.R. (Ed.). **Remington's Pharmaceutical Sciences**. 19<sup>th</sup> ed. Easton: Mack, 1995. Cap.20. p. 366-404.
- SCHUMACHER, H.; SMITH, R.L.; WILLIAMS, R.T. The metabolism of thalidomide: the fate of thalidomide and some of its hydrolysis products in various species. **British Journal of Pharmacology**, v. 25, n. 2, p. 338-351, 1965.
- SHEKUNOV, B.Y.; CHATTOPADHYAY, P.; TONG, H.H.Y.; CHOW, A.H.L. Particle size analysis in pharmaceuticals: Principles, methods and applications. **Pharmaceutical Research**, v. 24, p. 203-227, 2007.
- SHESKIN, J. Thalidomide in treatment of lepra reactions. **Clinical Pharmacology and Therapeutics**, v.6, p.303, 1965.
- Singhal, S. Antitumor activity of thalidomide in refractory multiple myeloma. **New England Journal of Medicine**, v.341, p.1565–71, 1999.
- SOLANS, C.; IZQUIERDO, P.; NOLLA, J.; AZEMAR, N.; GARCIA-CELMA, M.J. Nano-emulsions, **Current Opinion in Colloid and Interface Science**, v.10, n. 3-4, p. 102-110, 2005.
- SRINIVAS, S.; GUARDINO, A.E. A lower dose of thalidomide is better than a high dose in metastatic renal cell carcinoma. **BJU International**, v.96, n. 4, p. 536-539, 2005.
- STRICKLEY, R.G. Solubilizing Excipients in Oral and Injectable Formulations, **Pharmaceutical Research**, v. 21, n. 2, p. 201-230, 2004.
- SWEENEY, B.; PURI, P.; REEN, D.J. Modulation of immune cell function by polyunsaturated fatty acids, **Pediatric Surgery International**, v.21, n. 5, p. 335-340, 2005.

TADROS, T.; IZQUIERDO, P.; ESQUENA, J.; SOLANS, C. Formation and stability of nano-emulsions. **Advances in Colloid and Interface Science**, v.108-109, p. 303-318, 2004.

TAMILVANAN, S. Formulation of multifunctional oil-in-water nanosized emulsions for active and passive targeting of drugs to otherwise inaccessible internal organs of the human body, **International Journal of Pharmaceutics**, v. 381, n. 1, p. 62-76, 2009.

TAMILVANAN, S. Oil-in-water lipid emulsions: Implications for parenteral and ocular delivering systems. **Progress in Lipid Research**, v.43, n. 6, p. 489-533, 2004.

TEO, S.K.; CHANDULA, R.S.; HARDEN, J.L.; STIRLING, D.I.; THOMAS, S.D. Sensitive and rapid method for the determination of thalidomide in human plasma and semen using solid-phase extraction and liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences**, v. 767, n. 1, p. 145-151, 2002.

TEO, S.K.; COLBURN, W.A.; THOMAS, S.D. Single-dose oral pharmacokinetics of three formulations of thalidomide in healthy male volunteers. **Journal of Clinical Pharmacology**, v. 39, n. 11, p. 1162-1168, 1999.

TEO, S.K.; COLBURN, W.A.; TRACEWELL, W.G.; KOOK, K.A.; STIRLING, D.I.; JAWORSKY, M.S.; SCHEFFLER, M.A.; THOMAS, S.D.; LASKIN, O.L. Clinical pharmacokinetics of thalidomide. **Clinical Pharmacokinetics**, v. 43, n. 5, p. 311-327, 2004.

TEO, S.K.; SCHEFFLER, M.R.; KOOK, K.A.; TRACEWELL, W.G.; COLBURN, W.A.; STIRLING, D.I.; THOMAS, S.D. Thalidomide dose proportionality assessment following single doses to healthy subjects. **Journal of Clinical Pharmacology**, v. 41, n. 6, p. 662-667, 2001.

TRAPNELL, C.B.; DONAHUE, S.R.; COLLINS, J.M.; Thomas, S. D. Thalidomide does not alter the pharmacokinetics of ethinyl estradiol and norethindrone. **Clinical Pharmacology & Therapeutics**, v. 64, p. 597-602, 1998.

US PHARMACOPEIA/ THE NATIONAL FORMULARY (USP 29/NF24). Rockville: United States Pharmacopeial Convention, 2006.

US PHARMACOPEIA/ THE NATIONAL FORMULARY 31/26. **Globule Size Distribution in Lipid Injectable Emulsions**. Cap. 729, v. 1, p. 285–28, 2008.

VOGELSANG, G.B.; HESS, A.D.; GORDON, G.; SANTOS, G.W. Treatment and prevention of acute graft-versus-host disease with thalidomide in a rat model, **Transplantation**, v.41, n. 5, p. 644-647, 1986.

VOGELSANG, G.B.; HIGMAN, M.A. Chronic graft versus host disease. **British Journal of Haematology**, v.125, n. 4, p. 435-454, 2004.

WAITZBERG, D.L. Evolution of parenteral lipid emulsions. **Clinical Nutrition**, v. 1, n.3, p. 5-7, 2005.

WAITZBERG, D.L.; TORRINHAS, R.S.; JACINTHO, T.M. New parenteral lipid emulsions for clinical use, **Journal of Parenteral and Enteral Nutrition**, v.30, n. 4, p. 351-367, 2006.

WANG, Y.; YU, L.; HAN, L.; SHA, X.; FANG, X. Difunctional Pluronic copolymer micelles for paclitaxel delivery: Synergistic effect of folate-mediated targeting and Pluronic-mediated overcoming multidrug resistance in tumor cell lines, **International Journal of Pharmaceutics**, v.337, n.1-2, p. 63-73, 2007.

WANTEN, G.J.A.; CALDER, P.C. Immune modulation by parenteral lipid emulsions. **American Journal of Clinical Nutrition**, v.85, n. 5, p. 1171-1184, 2007.

WATANABE, M.I.; SHIROYAMA, T.; KONDA, G.; UMEKAWA, H.; TAKAHASHI, T.; YAMADA, Y.; FURUICHI, Y. Effects of castor oil on lipid metabolism in rats. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**, v.63, n. 3, p. 595-597, 1999.

WEBER, D.; RANKIN, K.; GAVINO, M.; DELASALLE, K.; ALEXANIAN, R. Thalidomide alone or with dexamethasone for previously untreated multiple myeloma. **Journal of clinical oncology**, v.21, n. 1, p. 16-19, 2003.

YAMAGUCHI, T. Lipid microspheres as drug carriers: A pharmaceutical point of view. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v.20, n. 2-3, p. 117-130, 1996.

YAN, J.W., WANG, J., HONG, Y.Z., HAI, B.H., TANG, X. Formulation, preparation and evaluation of flunarizine-loaded lipid microspheres. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 59, n. 3, p. 351-357, 2007.

YILMAZ, E.; BORCHERT, H. H. Effect of lipid-containing, positively charged nanoemulsions on skin hydration, elasticity and erythema - An in vivo study **International Journal of Pharmaceutics**, v. 307, n. 2, p. 232-238, 2006.

YOKOYAMA, K.; WATANABE, M. Limethason as a lipid microsphere preparation: An overview, **Advanced Drug Delivery Reviews**, v.20, n. 2-3, p. 195-201, 1996.

YU, W.; TABOSA DO EGITO, E.S.; BARRATT, G.; FESSI, H.; DEVISSAGUET, J.P.; PUISIEUX, F. A novel approach to the preparation of injectable emulsions by a spontaneous emulsification process. **International Journal of Pharmaceutics**, v.89, n.2, p. 139-146, 1993.

ZELDIS, J.B.; WILLIAMS, B.A.; THOMAS, S.D.; ELSAYED, M.E. S.T.E.P.S.(TM): A comprehensive program for controlling and monitoring access to thalidomide. **Clinical Therapeutics**, v. 21, n. 2, p. 319-330,1999.

ZHANG, H.Y., TANG, X., LI, H.Y., LIU, X.L. A lipid microsphere vehicle for vinorelbine: Stability, safety and pharmacokinetics. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 348, n. 1-2, p. 70-79, 2008.

ZHOU, S.; LI, Y.; KESTELL, P.; SCHAFER, P.; CHAN, E.; PAXTON, J.W. Transport of thalidomide by the human intestinal Caco-2 monolayers. **European Journal of Drug Metabolism and Pharmacokinetics**, v.30, n.1-2, p. 49-61, 2005.