



UNIVERSITAT DE
BARCELONA

Ritmos circadianos en la permeación dérmica y absorción transdérmica de melatonina

Ana Flo Sierra

ADVERTIMENT. La consulta d'aquesta tesi queda condicionada a l'acceptació de les següents condicions d'ús: La difusió d'aquesta tesi per mitjà del servei TDX (www.tdx.cat) i a través del Dipòsit Digital de la UB (diposit.ub.edu) ha estat autoritzada pels titulars dels drets de propietat intel·lectual únicament per a usos privats emmarcats en activitats d'investigació i docència. No s'autoritza la seva reproducció amb finalitats de lucre ni la seva difusió i posada a disposició des d'un lloc aliè al servei TDX ni al Dipòsit Digital de la UB. No s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX o al Dipòsit Digital de la UB (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant al resum de presentació de la tesi com als seus continguts. En la utilització o cita de parts de la tesi és obligat indicar el nom de la persona autora.

ADVERTENCIA. La consulta de esta tesis queda condicionada a la aceptación de las siguientes condiciones de uso: La difusión de esta tesis por medio del servicio TDR (www.tdx.cat) y a través del Repositorio Digital de la UB (diposit.ub.edu) ha sido autorizada por los titulares de los derechos de propiedad intelectual únicamente para usos privados enmarcados en actividades de investigación y docencia. No se autoriza su reproducción con finalidades de lucro ni su difusión y puesta a disposición desde un sitio ajeno al servicio TDR o al Repositorio Digital de la UB. No se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR o al Repositorio Digital de la UB (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto al resumen de presentación de la tesis como a sus contenidos. En la utilización o cita de partes de la tesis es obligado indicar el nombre de la persona autora.

WARNING. On having consulted this thesis you're accepting the following use conditions: Spreading this thesis by the TDX (www.tdx.cat) service and by the UB Digital Repository (diposit.ub.edu) has been authorized by the titular of the intellectual property rights only for private uses placed in investigation and teaching activities. Reproduction with lucrative aims is not authorized nor its spreading and availability from a site foreign to the TDX service or to the UB Digital Repository. Introducing its content in a window or frame foreign to the TDX service or to the UB Digital Repository is not authorized (framing). Those rights affect to the presentation summary of the thesis as well as to its contents. In the using or citation of parts of the thesis it's obliged to indicate the name of the author.



**UNIVERSITAT DE
BARCELONA**

FACULTAT DE FARMÀCIA

DEPARTAMENT DE FISIOLOGIA

DEPARTAMENT DE FARMÀCIA I TECNOLOGIA

FARMACÈUTICA

**RITMOS CIRCADIANS EN LA PERMEACIÓ DÈRMICA Y
ABSORCIÓ TRANSDÈRMICA DE MELATONINA**

ANA FLO SIERRA

Barcelona, 2015



UNIVERSITAT DE
BARCELONA

FACULTAT DE FARMÀCIA
DEPARTAMENT DE FISIOLOGIA
DEPARTAMENT DE FARMÀCIA I TECNOLOGIA
FARMACÈUTICA

Programa de doctorado:

RECERCA, DESENVOLUPAMENT I CONTROL DE MEDICAMENTS

RITMOS CIRCADIANS EN LA PERMEACIÓ DÉRMICA Y
ABSORCIÓN TRANSDÉRMICA DE MELATONINA

Memoria presentada por Ana Flo Sierra para optar
al título de doctor por la Universitat de Barcelona

Directoras de Tesis:

Ana C. Calpena Campmany

Trinitat Cambras Riu

Tutora:

Ana C. Calpena Campmany

Doctoranda:

Ana Flo Sierra

ANA FLO SIERRA

Barcelona, 2015

*A mis abuelos,
in memoriam*

*“When you make the finding yourself – even if you’re the last person
on Earth to see the light – you’ll never forget it.”*

Carl Sagan

AGRADECIMIENTOS

Cuando echo la vista atrás y pienso en cuando empecé el doctorado, soy consciente de lo mucho que he cambiado y he aprendido. El camino ha sido duro, pero sin duda ha merecido la pena. Hay muchas personas que de diversas formas han ayudado a que hoy esté al final del recorrido, y no querría acabar la tesis sin expresarles mi agradecimiento.

Mis primeras palabras de agradecimiento son para mis directoras de tesis oficiales, la Dra. Ana Calpena y la Dra. Trinitat Cambras y para el Dr. Toni Díez, que pese a no haber podido ser incluido como director, ha ejercido como tal durante toda la tesis.

Gràcies Ana pel teu recolzament tant a nivell personal com professional, per creure tant en mi i per tot el que m'has ensenyat. Mai podré agrair-te suficient el que has fet per mi durant tot aquest temps.

Gràcies Trini per endinsar-me en el apassionant món de la cronobiologia, per confiar en mi per tirar endavant aquesta tesis, per la teva rigurositat científica, el teu suport i la teva inestimable ajuda en la redacció dels articles.

Gràcies Toni pels teus consells, pel teu enginy i la teva organització tecnològica, per ensenyar-me a fer servir els teus programets i estar sempre disposat a ajudar en el que fes falta.

A tots 3, gràcies pels sacrificis que heu hagut de fer en les matinades, nits i caps de setmana a l'estabulari ajudant-me a fer els estudis de ritmes per aquesta tesis, adaptant-vos sempre als meus horaris.

A la Dra. Beatriz Clares, por ser mi mentora en el laboratorio de Biofarmacia en tu primera estancia en Barcelona. Hoy definiendo mi tesis gracias a ti, que me transmitiste tu amor por la investigación cuando aún era estudiante de Farmacia y me animaste a no dejarla.

Al Dr. Alfons del Pozo, per prestar-nos el Cutometer sempre que ho hem necessitat i per la teva disposició per resoldre els meus dubtes sempre que t'ho he demanat.

A Alexander, por tu valiosa ayuda con las administraciones, extracciones y los análisis con el HPLC, todo habría sido mucho más complicado sin tu ayuda. ¡En breve celebraremos también tu defensa de tesis!

A la Dra. María Luisa Garduño por tu ayuda y apoyo desde el otro lado del océano.

A la Dra. Lyda Halbaut por tu ayuda y consejos con los estudios de reología y por prestarme tu laboratorio para hacer mis cremas siempre que lo he necesitado.

Al Dr. Isidre Casals i al Dr. David Bellido, dels Serveis Científics de la UB, per la vostra ajuda amb l'anàlisi de les mostres de plasma.

A mis compañeros de departamento a lo largo de estos años, Erika, Mireia, Fran, David, Raquel, Judit y el resto, por los momentos que hemos compartido en el laboratorio y estar siempre dispuestos a ayudar.

A mis amigas y amigos, los más antiguos y los más nuevos, los que están cerca y los que están lejos, por todos los momentos que hemos vivido juntos, por estar a mi lado y darme ánimos siempre.

A mis compañeros de trabajo, gracias por animarme, preocuparos y por sacarme sonrisas todos los días, sobre todo en los últimos meses.

Y no me olvido de los pilares de mi vida...

Mamá y papá, gracias por vuestro amor incondicional, por estar siempre a mi lado, por haber creído en mí y por animarme a no abandonar en los momentos duros. Siempre estaré en deuda con vosotros por haberme dado tanto.

A ti Víctor, gracias por tu apoyo, por tus consejos y por tu conocimiento aportado en distintos momentos de esta tesis.

A ti Clara, gracias por alegrarme los días, por los sábados y domingos haciéndome compañía en la universidad entre medida y medida, a tu lado el tiempo siempre pasa mejor.

A Jose, Marta y al resto de mi familia, gracias por vuestros ánimos y palabras de aliento durante estos años.

A tu Marc, gràcies de tot cor, perquè tot i haver arribat en el tram més complicat del camí, has estat dia a dia al meu costat fent-me la vida més fàcil. Aquesta etapa s'acaba i ara comença una nova per nosaltres. T'estimo infinit.

ÍNDICE

ÍNDICE.....	i
ABREVIATURAS.....	v
CAPÍTULO I. INTRODUCCIÓN.....	1
1. ADMINISTRACIÓN TRANSDÉRMICA	3
1.1. La piel. Anatomía, fisiología y funciones.....	3
1.2. Vías de permeación cutánea	6
1.3. Formas farmacéuticas vía tópica.....	11
1.4. Estudios permeación transdérmica	18
2. RITMOS CIRCADIANOS	21
2.1. Parámetros del ritmo.....	22
2.2. Ajuste y representación de la función sinusoidal	22
2.3. Actograma	24
2.4. Sistema circadiano.....	25
2.5. Glándula pineal.....	28
2.6. Alteraciones del ritmo circadiano.....	28
3. MELATONINA.....	30
3.1. Mecanismos de acción.....	31
3.2. Administración exógena de MLT: usos.....	34
4. CRONOFARMACOCINÉTICA	38
4.1. Introducción a la farmacocinética.....	38
4.2. Cronofarmacocinética en ADME	46
4.3. Farmacocinética de la MLT.....	49
CAPÍTULO II. OBJETIVOS Y PLAN DE TRABAJO	55

CAPÍTULO III. RESULTADOS.....	59
Artículo 1.....	61
<i>Trends in Melatonin delivery: transdermal and transbuccal evaluation</i>	
Artículo 2.....	99
<i>In vivo and in vitro evaluation of the use of a newly developed melatonin loaded emulsion combined with UV filters as a protective agent against skin irradiation</i>	
Artículo 3.....	117
<i>Circadian rhythms on skin function of Hairless rat: light and thermic influences</i>	
Artículo 4.....	131
<i>Melatonin pharmacokinetics after transdermal administration changes according to the time of the day</i>	
Artículo 5.....	167
<i>Circadian variation of UV-induced erythema and the action of solar filters</i>	
CAPÍTULO IV. DISCUSIÓN.....	179
CAPÍTULO V. CONCLUSIONES	203
CAPÍTULO VI. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	207
ANEXO 1	225

ABREVIATURAS

AAAD	Aminoácido aromático descarboxilasa
ADN	Ácido desoxiribonucleico
AFMK	N-[3-[2-(formilamino)-5-metoxifenilo]-3-oxipropilo]-acetamida
AMK	N1-acetyl-5-methoxykynuramine
ARNm	Ácido ribonucleico mensajero
AUC_0^∞	Área bajo la curva desde tiempo 0 hasta infinito
BMAL1	<i>Brain and Muscle ARNT-Like 1</i>
C940	Carbopol [®] 940
CL _p	Aclaramiento plasmático
CLOCK	<i>Circadian Locomotor Output Cycles Kaput</i>
C _{max}	Concentración máxima
CRY	<i>Cryptochromes</i>
DD	Oscuridad constante
G6PDH	Glucosa-6-fosfato deshidrogenasa
DPPH	Radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo
GPx	Glutación peroxidasa
GRd	Glutación reductasa
GSH	Glutación
GSSG	Glutación disulfuro
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrógeno
HClO	Ácido hipocloroso
HIOMT	Hidroxindol O-metiltransferasa
IL	Interleucina
IV	Intravenosa
K ₁₀	Constante de eliminación
K ₁₂	Microconstante de distribución
K ₂₁	Microconstante de retorno
K _a	Constante de absorción
LD	Luz-Oscuridad
LL	Luz constante
LogP	coeficiente de reparto (expresado en logaritmo)
M68	Emulsión con Montanov [®] 68, PHE, MCT, MLT y agua
MBph	Emulsión M68 con 3Bph
MCT	Triglicéridos de cadena media
MLT	Melatonina
MMIX	Emulsión M68 con OS, OMC y 3Bph
MOMC	Emulsión M68 con OMC
MOS	Emulsión M68 con OS
MRT	Tiempo medio de residencia

NADPH	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato
NAT	N-acetil transferasa
NFκB	Factor nuclear potenciador de las cadenas kappa de las células B activadas
NK	Natural Killer
Nrf2	Factor Nuclear derivado de eritroide 2
NSQ	Núcleo supraquiasmático
O ₂	Oxígeno molecular
OMC	Octil metoxicinamato
ONOO ⁻	Peroxinitrito
OS	Octil salicilato
P407	Poloxámero 407
PER	<i>Period</i>
PHE	Perhidroescualeno
PLO	Poloxámero 407 lecitina organogel
ROR	Receptor huérfano relacionado con el ácido retinoico
ROS	Especies reactivas de oxígeno
RSA	Actividad de depuración de radicales
SCH	Hidratación del estrato córneo
SOD	Superóxido dismutasa
T _{CD4}	Linfocitos T colaboradores
TEWL	Pérdida de agua transepidérmica
t _{1/2}	Semivida
t _{max}	Tiempo en el que se alcanza la concentración máxima
TNF	Interferón
TPH	Triptófano-5-hidroxilasa
T _s	Temperatura cutánea
UV	Ultravioleta
V _c	Volumen en el compartimento central
V _{dss}	Volumen de distribución en estado de equilibrio estacionario
V _p	Volumen en el compartimento periférico
ZT	<i>Zeitgeber time</i>
·O ₂	Anión superóxido
·OH	Radical hidroxilo
¹ O ₂	Oxígeno molecular singulete
3Bph	Benzofenona 3

CAPÍTULO I. INTRODUCCIÓN

1. ADMINISTRACIÓN TRANSDÉRMICA

1.1. La piel. Anatomía, fisiología y funciones

La piel es un tejido grueso, resistente y flexible que recubre el organismo y que en el ser humano adulto tiene una superficie aproximada de 1,5 a 2 m² (Fore 2006). La piel está formada por 3 capas de tejidos diferenciados. La capa más externa es la epidermis y la siguen la dermis y la hipodermis, que es la capa más interna de la piel (Figura 1).

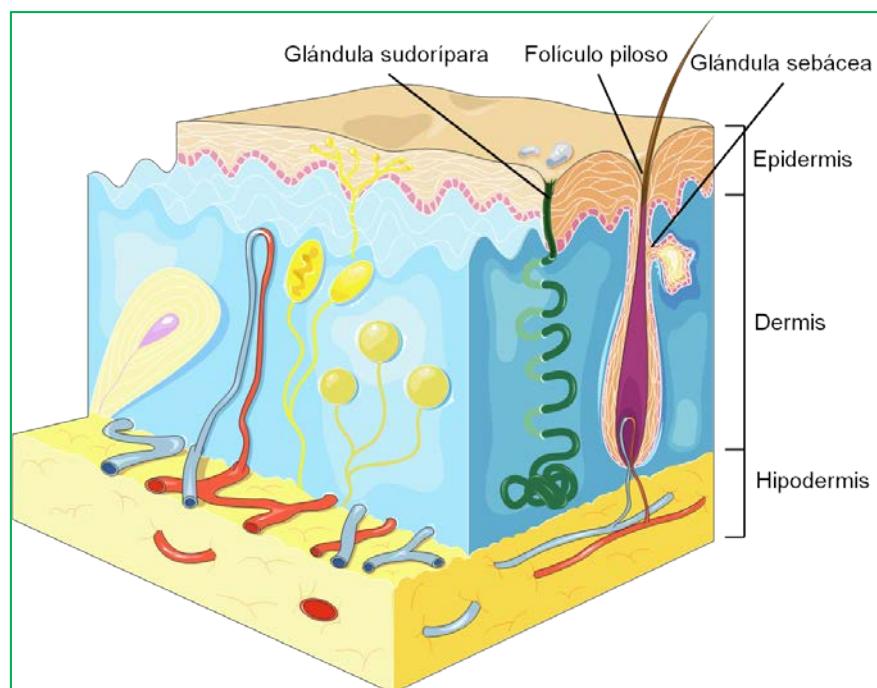


Figura 1: Estructura de la piel

A continuación se describen las características más relevantes de cada una de las capas:

Epidermis

Es la capa más externa de la piel. En los humanos su espesor varía de 0,04 mm a 1,6 mm dependiendo de la zona del organismo. Las células primarias en la epidermis son los queratinocitos, pero hay células adicionales tales como los melanocitos, las células de Langerhans y las células de Merkel (Figura 2). En la epidermis existen además tres tipos de apéndices: las glándulas sudoríparas, los folículos pilosebáceos y las uñas (Fore 2006).

La epidermis está compuesta por 4 capas distintas. Las 3 capas más internas forman la epidermis viable, que son capas vivas e hidrófilas (70% de agua) y está formada por el **estrato basal** que contiene una única capa de células basales columnares, que se unen a la membrana basal a través de hemidesmosomas y se compone de las células madre epidérmicas que por mitosis producen nuevos queratinocitos. Estas células evolucionan a medida que avanzan hacia la capa más superficial. Cuando los queratinocitos maduran, se convierten en el **estrato espinoso** y el **estrato granuloso**. En las zonas de piel muy gruesa, como son las palmas de las manos y de los pies, entre el estrato granuloso y el estrato córneo existe el **estrato lúcido**, que es una capa de células homogéneas y transparentes, sin núcleo e infiltradas de queratina, la cual reseca las células convirtiéndolas en células muertas del estrato córneo.

La capa más externa, denominada **estrato córneo**, es una capa hidrófoba (13% de agua) que está compuesto por células muertas y tiene una estructura rugosa. Está formada principalmente por corneocitos, que son queratinocitos terminalmente diferenciados. Es la responsable de la barrera de la piel que actúa protegiéndola, evitando la pérdida de agua, del mantenimiento de la hidratación de la piel y muchas otras funciones protectoras (Menon 2002).

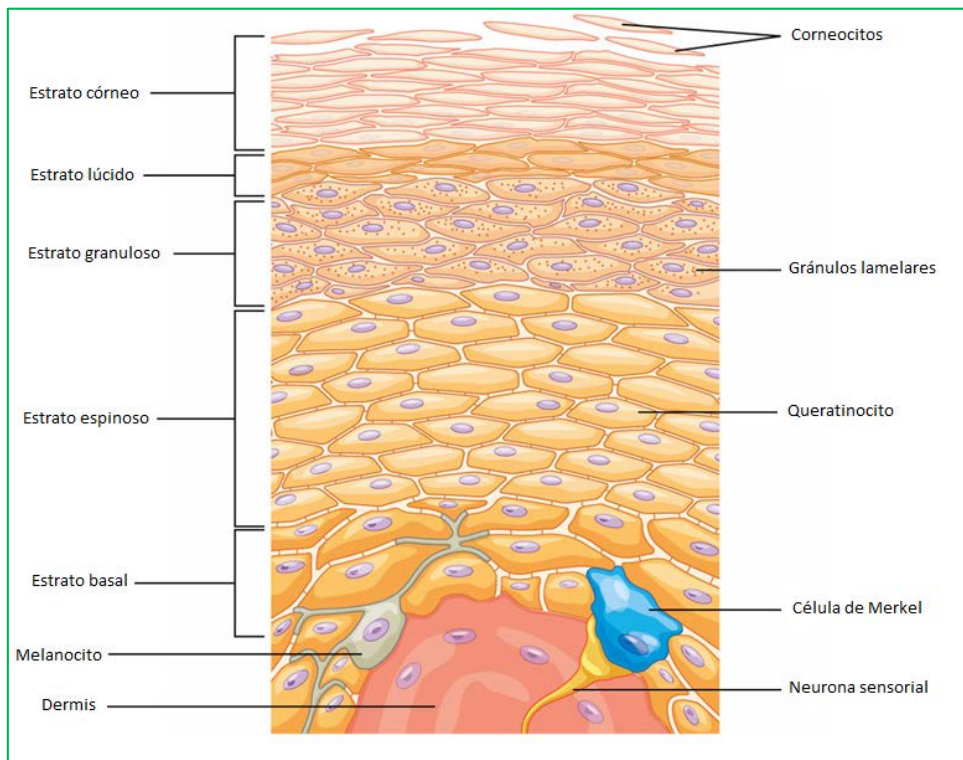


Figura 2. Epidermis (de OpenStax College [CC BY 3.0])

La piel proporciona una protección eficaz contra la penetración de sustancias extrañas, especialmente gracias a la capa córnea. Una sustancia hidrófila no puede penetrar la piel fácilmente, ya que no puede entrar en la capa hidrófoba del estrato córneo. Por otro lado, una sustancia hidrófoba, entra fácilmente en el estrato córneo pero permanece almacenada en su interior ya que la siguiente capa es hidrófila (Hadgraft & Guy 1989). Por lo tanto, las sustancias anfífilas son las que tienen más capacidad para penetrar la piel a través de la epidermis.

Una estructura anfífila es aquella que en la misma molécula posee dos regiones claramente diferenciadas. Una es la porción hidrófila o polar, que se caracteriza por su afinidad por disolventes polares como el agua. La otra porción es hidrófoba o apolar, y se caracteriza por presentar una atracción por disolventes orgánicos o apolares.

La estructura en capas de la epidermis se renueva continuamente. En una epidermis sana el período de rotación es de cerca de 28 días (Fore 2006).

Dermis

La dermis se encuentra entre la epidermis y la hipodermis. Mide entre 0,3 mm y 3,0 mm dependiendo de la zona del organismo. Es una capa hidrófila irrigada por la circulación sanguínea y está formada por una red densa de fibras de colágeno y elastina que proporciona resistencia mecánica a la piel.

La dermis está formada en un 90% por colágeno, fibras elásticas, vasos sanguíneos y linfáticos, algunas fibras musculares, glándulas pilosebáceas y sudoríparas, y el 10% restante lo componen componentes celulares, incluyendo fibroцитos, monocitos, histiocitos, células de Langerhans, linfocitos y eosinófilos, junto con la capa vascular y las células linfáticas asociadas (Menon 2002).

Cualquier sustancia que llega a esta capa puede pasar a la circulación sistémica (Bolzinger et al. 2012).

Hipodermis

Es la capa más interna de la piel. Se invagina en la dermis, con la que está unida por colágeno y fibras de elastina. Está compuesta por fibroblastos, células adiposas y macrófagos y una de sus funciones principales es la acumulación de grasa (Menon 2002).

1.2. Vías de permeación cutánea

El término permeación transdérmica describe el paso de compuestos a través de la piel. El proceso se divide en tres etapas: la penetración, que conlleva la entrada de una sustancia en la capa más externa de la piel, la permeación, que consiste en el paso de la sustancia de una capa a otra, y finalmente la absorción, que es el paso de la sustancia al sistema vascular (Hadgraft & Guy 1989).

1.2.1. Vías de penetración a través de la piel

El paso de las moléculas de fármaco a través de las membranas biológicas se produce mayoritariamente por difusión pasiva, de forma que las moléculas de fármaco van a favor de gradiente de concentración, pasando del compartimento en el que se encuentran en más concentración al menos concentrado.

Existen 2 posibles rutas para este paso, el primero sería a través de la epidermis, bien por vía intracelular o bien por vía intercelular y por otro lado, la vía apendicular, que incluye los folículos pilosos y las glándulas sudoríparas.

– Ruta epidérmica (Figura 3)

Es la vía mayoritaria y depende de propiedades fisicoquímicas de la sustancia, tales como el peso molecular, la solubilidad, el coeficiente de reparto y el pKa. También tienen influencia el metabolismo, el espesor del estrato córneo, la hidratación y la integridad de la piel y de los excipientes con los que el principio activo es vehiculizado.

- a) La vía intracelular o transcelular consiste en el paso del principio activo a través de la célula y es la vía más usada por las moléculas hidrófilas.
- b) La vía intercelular consiste en el paso del principio activo entre las matrices lipídicas de las células del estrato córneo. Es la vía más usada por las moléculas lipófilas.

Las moléculas que tienen carácter anfífilo pueden usar, por tanto, ambas vías.

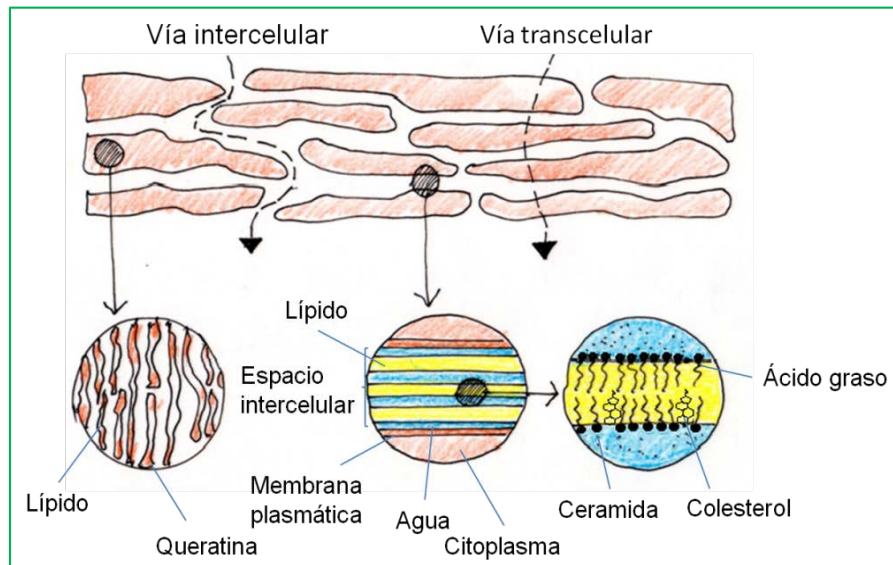


Figura 3. Esquema de la ruta epidérmica de paso del fármaco a través de la piel.

- Vía transapendicular: el paso de sustancias por esta vía acostumbra a producirse a través de los folículos pilosos.

1.2.2. Permeación cutánea

Tal y como se ha mencionado anteriormente, el proceso de permeación cutánea se divide en 3 etapas diferenciadas:

1. Penetración: es el proceso por el cual el fármaco entra en la primera capa de la piel. El proceso de penetración implica la liberación del principio activo del vehículo que lo contiene, debe por tanto disolverse y difundir hacia la interfase vehículo-estrato córneo. Para que esto ocurra, es importante que el vehículo o formulación sea adecuado, ya que es el que modula el proceso de liberación del fármaco en la piel.
2. Permeación: esta fase consiste en el paso del fármaco a través de la piel de una capa a otra, regido por un proceso de difusión pasiva (Doménech et al. 1998). El estrato córneo es la barrera que debe atravesar el principio activo para ir difundiendo a través de las distintas capas de la piel. Como se ha comentado anteriormente, las vías que pueden usarse en esta fase son la epidérmica y la transapendicular.
3. Absorción: en esta fase se produce el paso del principio activo a la circulación sistémica (Doménech et al. 1998).

1.2.3. Factores implicados en la permeación

Los factores que influyen en el paso de los principios activos a través de la piel se clasifican en factores fisicoquímicos de la piel y el fármaco y en factores fisiopatológicos de la piel.

1.2.3.1. Factores fisicoquímicos de la piel y el fármaco

Temperatura

Un incremento de la temperatura de la piel supone un aumento del flujo sanguíneo y, en consecuencia, de la velocidad de permeación y absorción del principio activo.

pH

La piel tiene un pH de 4,0 a 6,0. Estas condiciones de pH pueden afectar a la magnitud de disociación del principio activo y, por lo tanto, a su capacidad de permeación a través de la membrana. Por otro lado, en función del pH de la formulación y del pKa del fármaco, éste está ionizado en distinto grado. Las moléculas no ionizadas son las que poseen una mayor facilidad de permeación (Menczel & Goldberg 1978).

Hidratación

La hidratación del estrato córneo aumenta el porcentaje de absorción percutánea (Ritschel & Hussain 1988). Una de las explicaciones que se ha dado es que la hidratación incrementa las regiones acuosas de los dominios de lípidos intercelulares, lo que aumenta el carácter hidrófilo del estrato córneo. Esto, a su vez, conlleva a una reducción en el coeficiente de distribución entre el estrato córneo y la epidermis viable. Esto finalmente favorece la cinética de transferencia de fármacos desde el estrato córneo hasta la epidermis viable. Este mecanismo no funcionaría en los casos de moléculas que sean muy liposolubles o cuando estéricamente el paso está impedido por el gran tamaño de la molécula (Bronaugh & Maibach 1999). No obstante el incremento en la permeación de fármacos debido a una mayor hidratación no sólo depende del grado de hidrofilia sino también de la clase química a la que pertenece la molécula (Taylor et al. 2002; Cross & Roberts 2000).

Coefficiente de reparto

El coeficiente de reparto entre la capa córnea y el vehículo aplicado en la piel es un factor de gran importancia, ya que el estrato córneo se comporta como una membrana lipídica. Cuando el coeficiente de reparto se aproxima a la unidad, la permeación del principio activo a través de la piel es adecuada. En cambio, cuando el coeficiente está por debajo de este valor, las moléculas son demasiado hidrosolubles para poder disolverse en la capa córnea. Cuando el coeficiente de reparto es muy elevado, las moléculas quedan retenidas en la capa córnea o presenta grandes dificultades para atravesar las capas inferiores de carácter más hidrófilo (Leeson et al. 1990).

Constante de permeabilidad del principio activo

La constante de permeabilidad es una constante de velocidad directamente proporcional a la constante de difusión y al coeficiente de reparto.

Al mismo tiempo la constante de difusión viene afectada por el peso molecular del activo según la Ley de Stokes-Einstein (Ritschel & Hussain 1988), de forma que si el peso molecular aumenta, la constante de difusión disminuye.

Vehículo

El vehículo usado puede modificar la absorción del principio activo por dos motivos principales. El primero es la interacción entre el vehículo y el principio activo y el segundo, que la aplicación de vehículos farmacéuticos, tales como geles, emulsiones, cremas o ungüentos, puede provocar cambios en la piel afectando a su permeabilidad (Ritschel & Hussain 1988). Los mecanismos por los que pueden provocar cambios son una acción disolvente del estrato córneo, un incremento en la hidratación o un incremento de la temperatura (Maibach 1984).

Propiedades reológicas

La formulación debe poseer una adecuada extensibilidad y adaptabilidad a la superficie y cavidades cutáneas. Para ello, es recomendable que sean flujos de tipo plástico-tixotrópico, caracterizados por un aumento de la fluidez durante la aplicación, seguida de

una recuperación de la textura inicial después de la extensión del producto, lo que permite mantenerlo localizado y adherido a la zona de aplicación.

Concentración del principio activo

La penetración del principio activo se produce por un proceso de difusión pasiva (Leeson et al. 1990) y, por lo tanto, depende del gradiente de concentraciones de las moléculas de principio activo disueltas en el medio que se produce entre el vehículo y las capas de piel.

1.2.3.2. Factores fisiopatológicos

Estado de la piel

La piel actúa de barrera protectora del organismo y por lo tanto, cualquier patología, lesión o erupción que altere la integridad o continuidad de la piel afectará al efecto barrera y, en consecuencia, supone un aumento de la permeabilidad.

Edad

La permeabilidad de la piel varía en función de la edad. De esta forma, en niños la permeabilidad es superior que en adultos, debido a que el grosor de su estrato córneo es menor (Ritschel & Hussain 1988). En cambio, en edades avanzadas, la permeabilidad se ve disminuida debido a una atrofia epidérmica y a una disminución del flujo.

Flujo sanguíneo

Un incremento en el flujo sanguíneo conlleva un incremento de la velocidad con la que las moléculas difunden a través de la piel, ya que se produce una diferencia de gradiente de concentración mayor (Ritschel 1971).

Zona de aplicación

Las distintas regiones de la piel presentan diferencias en las permeabilidades, debido principalmente a diferencias en el espesor y al grado de vascularización (Ritschel 1971).

Metabolismo

La epidermis es un tejido que presenta actividad enzimática. En la superficie de la piel se producen reacciones de oxidación y reducción, reacciones de hidrólisis y reacciones de conjugación. Al ser la piel un órgano metabólicamente activo, algunas sustancias se metabolizan durante su paso a través de la piel (Schaefer & Filaquier 1992; Baron & Merk 2001).

1.3. Formas farmacéuticas vía tópica

En todas las formulaciones existe un vehículo, que es la parte inactiva de la formulación y la parte activa, que está formada por uno o varios principios activos, que cuando se liberan del vehículo ejercen su función, bien a nivel local o bien a nivel sistémico. Las formas farmacéuticas para vía tópica más comunes son:

- *Formas líquidas*: colirios, gotas nasales y óticas, lociones y linimentos.
- *Formas sólidas*: Polvos dérmicos, óvulos, tabletas y cápsulas vaginales.
- *Formas semisólidas*: ungüentos, pomadas, cremas (emulsiones) y geles (hidrogeles).
En este grupo se encuentran las formas farmacéuticas más comúnmente utilizadas para la vehiculización de fármacos a través de la piel. A continuación se profundizará en los geles y las emulsiones.

1.3.1. Geles

Los geles son formas farmacéuticas semisólidas, transparentes u opacos, que contienen un alto porcentaje de disolvente frente al del gelificante. La relación de tamaño de las partículas dispersas puede variar desde nanómetros hasta cuerpos reconocibles con luz óptica, macromoléculas, cristales iónicos o moleculares.

La estructura de los geles está formada por un armazón compuesto de elementos de fase sólida, que entran en contacto en diferentes lugares llamados puntos de adhesión que los mantienen unidos entre sí mediante fuerzas de Van der Waals y enlaces por puentes de hidrógeno. La fase líquida se distribuye en este armazón, dando lugar a una estructura flexible.

Los geles hidrófilos se clasifican en hidrogeles si la naturaleza del componente líquido es agua, u organogeles, si el componente líquido es una disolvente orgánico (Almeida et al. 2012).

Los **hidrogeles** son geles en los cuales los materiales poliméricos entrecruzados en forma de red tridimensional se inflan en contacto con el agua, formando materiales blandos y elásticos, de un tamaño que oscila entre 10 nm y 1 μm y que retienen una fracción significativa de esta agua en su estructura sin disolverse (Qiu & Park 2001). Pueden tener una gran resistencia mecánica (De Queiroz et al. 2006) según el método con el que se obtenga.

Las dispersiones poliméricas acuosas son muy útiles como plataformas de administración de fármacos, ya que pueden resistir el estrés fisiológico causado por la flexión de la piel, adoptando la forma de la zona de aplicación y pudiendo liberar el fármaco de forma controlada (Yonese 2001). Por otro lado, al tratarse de materiales inertes, las células y las proteínas no tienden a adherirse en su superficie (Perez 2006) y por lo tanto, destaca su uso como vehículo para la liberación controlada de fármacos.

Los **organogeles** son geles en los cuales los materiales poliméricos se disuelven en disolventes orgánicos. Estos vehículos han sido utilizados también para la liberación de fármacos por vía tópica o transdérmica (Almeida et al. 2012).

Existen numerosos polímeros que han sido usados para la elaboración de geles hidrófilos para uso farmacéutico, entre los que se encuentran los polímeros sintéticos y los copolímeros en bloque.

Polímeros sintéticos

- Carbopol

El C940 es un polímero sintético de ácido acrílico de cadenas entrecruzadas y elevado peso molecular. Cuando se neutraliza aumentando el pH por encima de 6 forma un gel de elevada viscosidad.

Al dispersarse en agua forma soluciones ácidas coloidales de baja viscosidad e incrementa su volumen original hasta 1000 veces y 10 veces su diámetro. Su neutralización origina un incremento en la viscosidad dando lugar a una red

tridimensional que constituye la estructura de gel (Figura 4). Los agentes neutralizantes más usados son el hidróxido de potasio, el hidróxido sódico y algunas aminas polares orgánicas, como la trietanolamina y la estearilamina. Pierde rápidamente viscosidad si se expone a radiación UV, pero esta pérdida se minimiza si se le adiciona un antioxidante o si se utiliza la trietanolamina como agente neutralizante (Koleng & McGinity 2006).

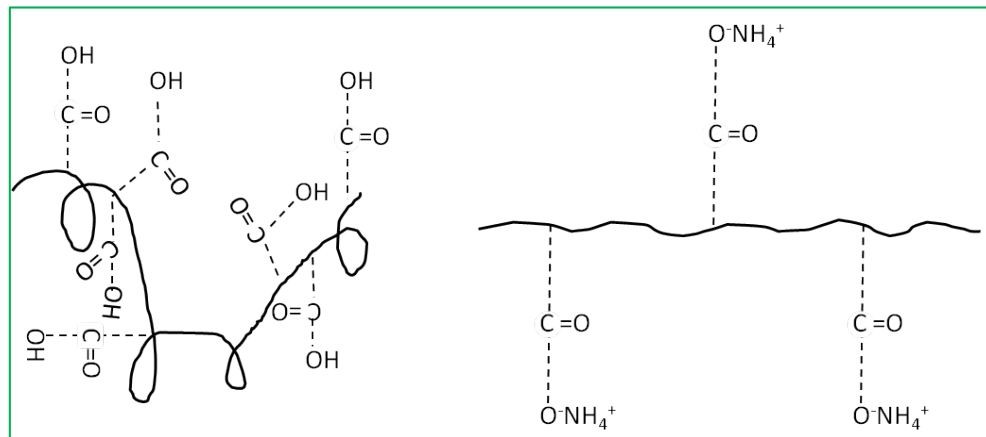


Figura 4. Representación esquemática del polímero de C940 antes y después de su neutralización con trietanolamina.

Poloxámeros o copolímeros en bloque

Los copolímeros en bloque están formados por macromoléculas constituidas por bloques poliméricos dispuestos en una secuencia lineal. Entre los copolímeros en bloque con aplicaciones farmacéuticas destacan los anfífilos, que poseen bloques lipófilos unidos a bloques hidrófilos. Poseen propiedades tensioactivas y forman diferentes clases de asociaciones, tales como micelas y estructuras líquido-cristalinas, que pueden actuar como excelentes vehículos de principios activos.

Los poloxámeros son copolímeros biocompatibles y sensibles a la temperatura. Están formados por una triple cadena que contiene dos polioóxidos de etileno rodeando un polioóxido de propileno y son tensioactivos no iónicos. Existen diversos poloxámeros en función de las cadenas hidrófilas de óxido de etileno y las hidrófobas de óxido de propileno.

Debido a que son solubles en agua, permiten disminuir la tensión interfacial, emulsionar sustancias insolubles y formar micelas y vesículas en solución acuosa, atrapando distintos componentes en su interior.

- **Poloxámero 407**

El P407 es un copolímero no iónico de 3 bloques, con una cadena central hidrofóbica de polioxipropileno (PPO) y 2 cadenas laterales hidrófilas de polioxietileno (PEO) (Figura 5). Este copolímero tiene una buena capacidad de solubilización, baja toxicidad y una alta capacidad de carga de fármaco, por lo que se considera un buen vehículo para la administración de fármacos.

Por encima de la concentración micelar crítica y de la temperatura micelar crítica, se reduce la solubilidad del óxido de propileno en solución acuosa, dando lugar a la formación de la micela. Al aumentar simultáneamente la concentración y la temperatura da lugar a la formación de agregados multimoleculares que tienen un núcleo central hidrófobo con las cadenas de polioxiteleno hidrófilas orientadas hacia el medio externo.

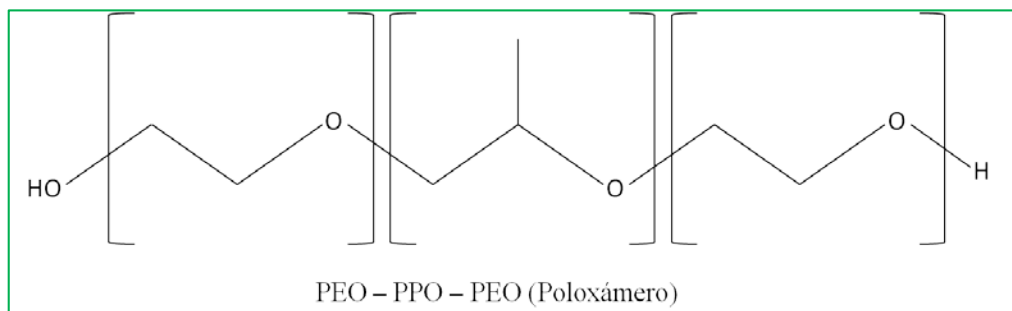


Figura 5: Estructura tribloque del P407

En ensayos de liberación *in vitro*, se ha demostrado que la liberación de fármacos disminuye con el aumento de la concentración de Poloxámero, debido posiblemente al aumento del tamaño y número de micelas y una disminución posterior del tamaño y número de canales acuosos (Gilbert et al. 1986).

El P407 puede formar nanogeles termorreversibles, es decir, que son líquidos a temperatura refrigerada (4-5°C) pero a temperatura ambiental gelifican (Almeida et al. 2012), lo que permite su uso para la mayor parte de vías de administración, como son la dérmica (Padilla et al. 2000), la intranasal (Jain et al. 1991), la vaginal, la rectal (Ryu et al. 1999) y la ocular (Lin & Sung 2000).

- **PLO**

El PLO es un organogel basado en una microemulsión formada por una fase acuosa de P407 y una fase oleosa formada por lecitina de soja (fosfolípido) e isopropil palmitato (solvente orgánico).

Es termodinámicamente estable, viscoelástico y biocompatible. La coexistencia de las fases orgánica y acuosa por medio de una red micelar de fosfolípidos estructuralmente bien definida, una gran área interfacial y la posibilidad de atrapar solutos dentro de la matriz de gel, hace que este organogel sea útil para una gran variedad de aplicaciones.

Ha sido ampliamente usado para la liberación de fármacos hidrófilos y lipófilos por vía tópica y transdérmica a través del estrato córneo, ya que el gel de lecitina es capaz de desorganizar levemente la estructura de la piel, lo que incrementa la permeación de los fármacos (Almeida et al. 2012). Además, su matriz microestructural organizada, su anfifilia, su capacidad de súper solubilización y la interacción con los lípidos de la piel, son algunos de los principales factores que favorecen un mayor transporte de fármacos a través de la piel cuando son vehiculizados con PLO (Almeida et al. 2012).

Los estudios *in vivo* sugieren que los geles de la PLO son un buen vehículo para acción local de fármacos aplicados sobre la piel, ya que muestran una excelente permeabilidad del fármaco por difusión a través de la matriz intracelular de lípidos y por una ligera desorganización de la piel provocada por la lecitina (Almeida et al. 2012).

1.3.2. Emulsiones

Las emulsiones son sistemas heterogéneos que contienen 2 fases inmiscibles, una acuosa y una oleosa. En función de cuál es la fase externa las emulsiones se clasifican en (1) emulsiones de fase externa acuosa (o/w) y (2) emulsiones de fase externa oleosa (w/o). Existen también emulsiones múltiples, en las que gotas de un líquido están dispersas dentro de gotas más grandes de un segundo líquido y que a su vez están dispersas en un tercer líquido. Estas emulsiones pueden ser (1) o/w/o, con la fase más externa oleosa o (2) w/o/w, con la fase más externa acuosa (Maibach 1984).

La preparación de una emulsión requiere un gran aporte de energía para la formación de una gran área interfacial entre dos líquidos inmiscibles. Esta energía permanece en el

sistema como energía potencial, lo que hace que las emulsiones sean termodinámicamente inestables y con el tiempo tiendan a producirse fenómenos de desestabilización, algunos son reversibles, como la **sedimentación**, que consiste en el desplazamiento vertical de las gotas debido a la acción de la gravedad; la **floculación**, debida a la asociación de gotas formando agregados. Pero otros son irreversibles, como es el caso de la **coalescencia**, que supone la ruptura de la película interfacial y la consiguiente ruptura de la emulsión o la **maduración de Ostwald**, en las que las gotas más pequeñas se solubilizan en las mayores, provocando un aumento del tamaño de las gotas. Para evitar estos procesos de desestabilización acostumbran a usarse emulsionantes, que realizan dos funciones principales, reducir la tensión interfacial y retardar el proceso de reversión de la gota que acaba separando las dos fases. Existen 3 tipos de emulsionantes principales: coloides hidrófilos, sólidos finamente divididos y tensioactivos (Myers 2002).

Tensioactivos no iónicos

Los tensioactivos representan el mecanismo de estabilización más común. Son sustancias químicas naturales o sintéticas de estructura anfífila que modifica la tensión superficial en las interfases gas/sólido, gas/líquido o líquido/líquido (aceite-agua) (Attwood & Florence 1983).

Los tensioactivos se clasifican en base a su capacidad de disociación del agua y por tanto, en función de su grupo hidrófilo en catiónicos, aniónicos, anfóteros y no iónicos (Effendy & Maibach 1995; Salager 2002; Porter 1991).

En los tensioactivos no iónicos el grupo hidrófilo (alcohol, fenol, éter, éster o amida) no se puede disociar y por lo tanto no se ionizan en soluciones acuosas. Al no formarse iones, acostumbran a producir poca irritación de la piel y favorecen la compatibilidad con el principio activo. Entre los tensioactivos no iónicos más comunes se encuentran los polisorbatos y los alquilpoliglucósidos como el Montanov[®].

- MontanovTM

La serie MontanovTM es una gama de tensioactivos emulsionantes no iónicos de origen natural que se usan para la formulación de emulsiones o/w. Entre ellos se encuentra el Montanov 68. Es de origen vegetal y está formado por alcohol cetearílico y glucósido

cetearílico derivados del extracto de mandioca y de las grasas extraídas del aceite de coco. El grupo etoxilado se encuentra sustituido por un hueco natural, por lo que se obtiene un producto formado por un glucolípido hidrófilo y una cadena grasa lipófila de coco.

Las emulsiones que se obtienen con Montanov[®] 68 tienen una naturaleza tixotrópica relativamente ligera. Por otro lado, las variaciones de temperatura tienen un pequeño efecto en la consistencia de las emulsiones, a mayor temperatura la viscosidad disminuye ligeramente, lo que facilita su aplicación. Esto es una ventaja considerable para las formulaciones de protectores solares en los que la piel se expone a altas temperaturas.

Cuando actúa como emulsionante, no forma gotas convencionales sino que da lugar a una estructura de cristal líquido liotrópico laminar con birrefringencia negativa, con predominancia de gel, por lo que las bicapas se presentan de forma ordenada y rígida (Figura 6). Los cristales líquidos combinan propiedades de los estados sólido y líquido ya que presentan orientación espacial pero permanecen fluidos. Esta estructura laminar presenta grandes ventajas, como la mejora de la hidratación de la piel, ya que limita la pérdida de agua transepidérmica, con lo que favorece la permeación de fármacos, modula la liberación y permeación de los principios activos y previene la deshidratación de la epidermis (Pasquali et al. 2006).

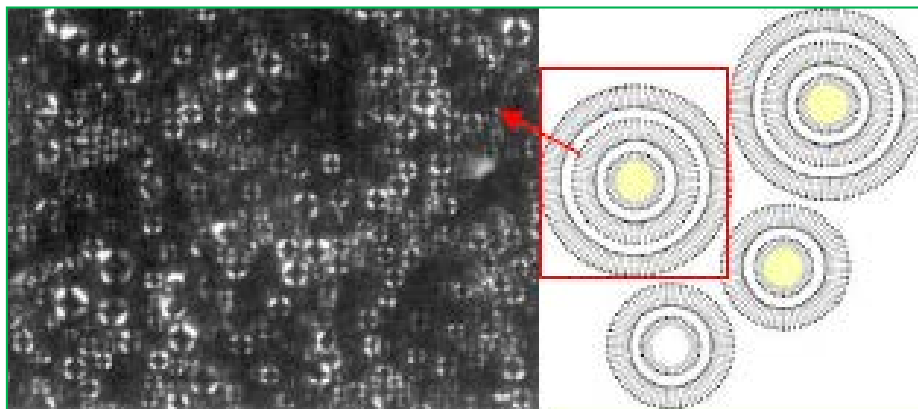


Figura 6. Cristales líquidos de una emulsión de Montanov (Luz polarizada, microscopio óptico 400x (izquierda). Organización de Montanov en bicapas laminares alrededor de gotas de aceite (derecha) (Fuente: SEPPIC).

1.4. Estudios permeación transdérmica

Para evaluar la capacidad de un fármaco para ser formulado y administrado transdérmicamente, se pueden utilizar métodos *in vivo* e *in vitro* o *ex vivo*.

1.4.1. Métodos *in vitro*

Los estudios de permeación *in vitro* se utilizan ampliamente para investigar la difusión transdérmica de los fármacos, ya sea a partir de la solución libre de fármaco o a partir de una formulación. Constituyen una parte importante dentro del desarrollo de una forma de administración transdérmica y suministran una información básica acerca de las posibilidades de formular un fármaco determinado por vía transdérmica.

Estos estudios tienen como objetivo calcular el flujo transdérmico de fármaco a partir de la formulación ensayada y, en función de este valor, predecir su absorción transdérmica *in vivo*, además de poder establecer correlaciones entre *in vitro/in vivo*.

El tipo de membrana óptimo es el de piel humana, sin embargo es posible utilizar piel de roedor o de cerdo, teniendo en cuenta las diferencias histológicas y la relación entre la permeabilidad de la piel usada y la piel humana (Doménech et al. 1998).

En los estudios de permeación con piel, es necesario el control de la temperatura, que en el caso de la piel humana debe estar a treinta y dos grados centígrados, con un margen de más menos un grado.

En el caso de estudios en los que se busca determinar la capacidad de un fármaco para liberarse del vehículo que lo contiene, puede ser muy adecuado también el uso de membranas artificiales.

Para la realización de los estudios de permeación *in vitro*, se emplean las denominadas Células de difusión de Franz. Este dispositivo está formado por dos compartimentos separados por la membrana de permeación. El primer compartimento o compartimento dador, es el que contiene el fármaco, mientras que el otro, denominado compartimento receptor, contiene una solución homogénea en la que se depositará el fármaco que atraviese la membrana (Doménech et al. 1998).

1.4.2. Métodos *in vivo*

Los estudios *in vivo* son sin duda más complejos, ya que requieren de sujetos vivos de experimentación, que pueden ser animales o humanos voluntarios.

El proceso se inicia con la delimitación de una superficie de piel, en la que se dispone la formulación que contiene el fármaco, garantizando que ésta se mantiene en contacto íntimo con la estructura cutánea.

A tiempos prefijados se toman muestras de heces, tejidos o fluidos biológicos y se determina, mediante un procedimiento analítico adecuado, la cantidad de fármaco contenido en cada muestra.

Este tipo de ensayo debe complementarse con la administración del fármaco al sujeto de estudio por vía parenteral, con el fin de obtener información sobre los valores intrínsecos del fármaco en el organismo y opcionalmente por vía oral, para realizar una comparativa de la biodisponibilidad. Teniendo en cuenta que la velocidad de absorción a través de la piel es baja, la metodología debe poseer un límite de cuantificación adecuado (Doménech et al. 1998).

Con carácter previo a cualquier experimentación es necesario conocer el grado de toxicidad de las sustancias a utilizar, con el fin de acotar tanto el área de exposición al fármaco, como la dosis a aplicar.

En el caso de experimentación con **animales**, es preciso conocer las diferencias de permeabilidad en relación a la piel humana. Debido a que la piel de algunos animales, como por ejemplo la rata, son más permeables que la piel humana, los resultados están sobreestimados respecto a lo que se obtendría aplicándolos en humanos (Doménech et al. 1998). No obstante, existen ecuaciones que permiten relacionar los parámetros obtenidos tras la permeación en piel de rata con las que se obtendrían en humanos, siempre y cuando se disponga de información sobre el comportamiento del fármaco aplicado *in vitro* en piel humana (Godin & Touitou 2007).

En el caso de los estudios en **humanos**, el objetivo es el mismo, determinar la cantidad de fármaco que se absorbe a partir de la aplicación de una determinada dosis sobre la piel. Estos estudios requieren una supervisión muy rigurosa.

Tanto en animales de experimentación como en voluntarios, una vez analizadas las muestras, se obtiene un tabulado experimental que cuantifica las concentraciones plasmáticas de fármaco a cada tiempo de toma de muestra. A partir de los tabulados y mediante el análisis farmacocinético adecuado, se obtiene la información sobre el ADME del fármaco en el organismo y si las concentraciones plasmáticas obtenidas alcanzan las concentraciones terapéuticas requeridas (Doménech et al. 1998).

2. RITMOS CIRCADIANOS

Un ciclo es una sucesión de acontecimientos que tienen lugar de forma ordenada y repetitiva sin tener en cuenta el tiempo en el que ocurren. Cuando esto se produce en un intervalo de tiempo constante y predecible se habla de ritmo (Díez-Noguera 2005b). Se define como ritmo biológico a la recurrencia de fenómenos dentro de un sistema biológico con intervalos regulares (Aschoff et al. 1981; Mora & Sanguinetti 1994).

Los ritmos biológicos son de origen genético y son generados por el propio organismo (Hardin et al. 1990; García Fernández 1998). No obstante, existen ciertos elementos externos que el organismo utiliza como referencias temporales para poder encarrilar sus ritmos. Estos elementos se denominan sincronizadores o *zeitgebers* (Aschoff & Pohl 1978) y son capaces de modular y ajustar los relojes biológicos internos del individuo de forma rítmica (Halberg et al. 1959; Steinbach 1976; Reinberg et al. 1979).

Los ritmos biológicos pueden clasificarse en función de su período, tomando como base el día. De entre ellos, adquieren una especial importancia los ritmos circadianos por sus aplicaciones en el campo de las ciencias biomédicas. Etimológicamente, circadiano procede de las palabras *circa dian* que significa alrededor del día. Así, los ritmos circadianos son aquellos cuyo período se encuentra entre 20 y 28 horas.

En condiciones de luz y temperatura constantes, los seres vivos presentan ritmos espontáneamente, según su período intrínseco, también denominado período en curso libre.

Sin embargo, debido a la presencia de sincronizadores externos, los ritmos circadianos pueden ser sincronizados con el ciclo externo de 24 horas. El *zeitgeber* más importante es el ciclo de LD, pero también lo son el ciclo de alimentación, el ejercicio físico, la temperatura ambiental o los contactos sociales (Cambras & Díez 2014).

Los ritmos circadianos se manifiestan en prácticamente cualquier función (variable) del organismo.

2.1. Parámetros del ritmo

Con el fin de analizar y cuantificar un ritmo, los valores de una variable obtenidos a lo largo de un ciclo pueden ajustarse a una función sinusoidal, a partir de la cual pueden determinarse una serie de parámetros, tales como el período, el mesor, la fase o acrofase y la amplitud.

- *Período*: es el tiempo necesario para que transcurra un ciclo completo.
- *Mesor*: Es el valor medio de una función rítmica ajustada a los datos de una serie temporal, alrededor de la cual oscila la variable (Halberg 1977).
- *Fase*: es un momento determinado del ritmo. Para caracterizar la fase normalmente se utiliza la acrofase. La *Acrofase* es el parámetro que define el momento en el que se encuentra el valor máximo de una variable en un patrón optimizado de su ritmo cronobiológico. La referencia puede ser (1) arbitraria, por ejemplo la hora 0 del inicio del estudio, (2) interna, por ejemplo la acrofase de otro ritmo biológico con la misma frecuencia en el organismo, o (3) externa, por ejemplo el inicio de la fase de luz en un ciclo de luz-oscuridad (Díez-Noguera 2005a). La fase se expresa en unidades de tiempo, ángulo o episodio fisiológico.
- *Amplitud*: es la mitad de la máxima variabilidad de una variable en el período determinado. En una curva sinusoidal sería la distancia entre el punto máximo o mínimo hasta el Mesor (Halberg 1977).

2.2. Ajuste y representación de la función sinusoidal

El método cosinor consiste en ajustar los puntos experimentales a una función sinusoidal (Figura 7) para poder cuantificar las características del ritmo y hacer una representación gráfica del mismo.

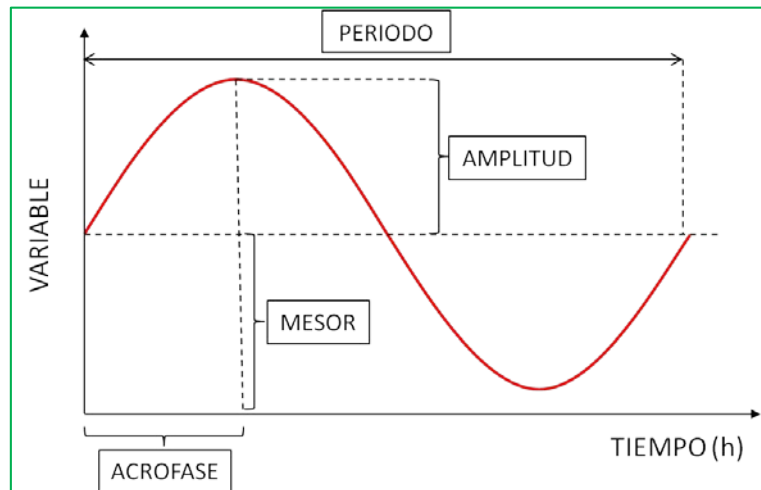


Figura 7: Representación de la función sinusoidal de una variable rítmica.

El modelo matemático que se debe usar requiere la utilización de una función cosenoidal, en concreto la función usada es el cosinor, cuya expresión matemática se define en la Ecuación 1 (Díez-Noguera 2005b).

$$y = M + A \cos(f - \omega t) \quad (\text{Ecuación 1})$$

Donde M es el mesor, A la amplitud, f la fase, t es el tiempo y ω es la velocidad angular, que en el caso de un ritmo circadiano de 24 h con el tiempo expresado en horas equivale a $2\pi/24 = 0,2618$ radianes/h.

La aplicación del método del cosinor implica la representación gráfica de los resultados mediante un tipo de gráfica que consiste en la representación horaria del vector definido por la amplitud y la acrofase (Figura 8).

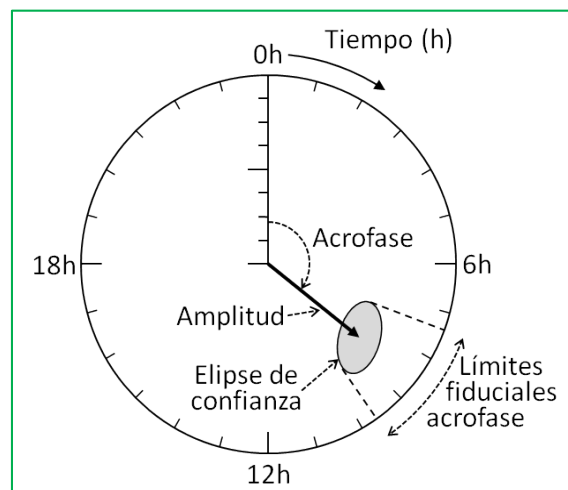


Figura 8: Representación gráfica de una variable rítmica por el método cosinor.

Para ello se representa un círculo que corresponde a un reloj imaginario de 24 horas, de tal forma que las 0 horas se encuentran en la parte superior, las 6 am a la derecha, las 12 horas en la parte inferior y las 6 pm a la izquierda. En su interior se representa un vector cuya longitud es proporcional a la amplitud del ritmo y cuyo extremo apunta a la hora del día correspondiente a la acrofase. Dado que tanto la amplitud como la acrofase tienen límites fiduciales, estos se representan conjuntamente formando una elipse en torno al extremo del vector. Si la elipse es muy grande y llega a incluir el centro del círculo, indica que no existe ritmo estadísticamente significativo para esa variable, ya sea por exceso de variabilidad en los datos, porque se posee un número limitado de éstos o porque no existe ritmo (Díez-Noguera 2005b).

2.3. Actograma

Cuando se dispone de series temporales relativamente cortas, su representación cartesiana o cronograma puede ser útil para detectar visualmente la presencia de periodicidades y el ajuste a una función sinusoidal permite fácilmente su caracterización. No obstante, cuando las series son muy largas, no es posible observar a simple vista la estructura del ritmo. Para poder visualizar estas series de datos, un método gráfico eficaz es la doble gráfica o *double plot* (Díez-Noguera 2005b).

Este tipo de gráficas son muy utilizadas en los registros de actividad, en cuyo caso se denominan actogramas. En ellos, cada movimiento queda registrado como una raya negra dentro de la serie temporal que se está estudiando. De esta forma, las fases de actividad producen una mayor densidad de negro que las fases de reposo. Cada intervalo de 24 horas se coloca en una línea, de forma que cada día queda debajo del anterior.

Si el ritmo es de 24 horas, cada día el movimiento empezará y finalizará a la misma hora por lo que se acabaría viendo el conjunto como una franja vertical más oscura y una más clara. En cambio, si el ritmo fuera superior a 24 horas, se iría produciendo un desplazamiento diario de la franja de actividad hacia la derecha, mientras que si el período fuera inferior se observaría un desplazamiento hacia la izquierda. Para facilitar la visualización de estos datos, la gráfica se representa duplicada. La utilización de este tipo de gráficas, permite un análisis visual de los datos de gran valor y precisión (Díez-Noguera 2005b).

2.4. Sistema circadiano

La presencia de ritmos circadianos en los seres vivos se debe a la existencia de un sistema fisiológico, sistema circadiano, capaz de generar ritmos espontáneamente y de transmitir esta información al resto del organismo.

El sistema circadiano está formado por un reloj central, un conjunto de relojes periféricos y una serie de vías aferentes y eferentes, que los aportan y les permiten enviar información (Hofman 2004; Buijs & Kalsbeek 2001).

2.4.1. Reloj central

Tanto en los humanos como en el resto de mamíferos, el *pacemaker* más importante es el NSQ, ubicado en el hipotálamo ventral (Figura 9). El NSQ recibe señales luminosas transmitidas desde la retina a través del tracto retinohipotalámico (Weinert 2005) que encarrilan el reloj central al ciclo LD. Genera y coordina los ritmos circadianos de diversas funciones fisiológicas, endocrinas y del comportamiento (Hofman 2004).

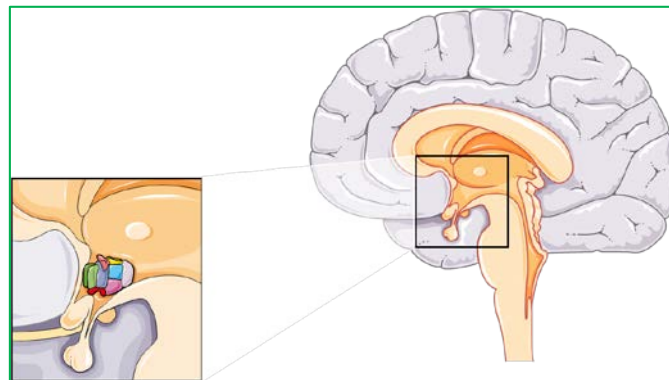


Figura 9. Localización del hipotálamo y del NSQ.

En los mamíferos, el NSQ está formado por dos núcleos simétricos y ovalados, situados en la parte ventral del hipotálamo, por encima del quiasma óptico. Esta estructura genera oscilaciones espontáneamente tanto *in vivo* como *in vitro* y las transmite al resto del organismo. La lesión de este núcleo produce una pérdida de los ritmos circadianos de comportamiento y algunas funciones fisiológicas como son la actividad motora, el ciclo de sueño-vigilia, la ingesta de alimentos, la temperatura y la secreción hormonal, tanto en hombre como en otros mamíferos (Moore & Eichler 1972; Kafka et al. 1985; Meijer & Rietveld 1989; Leak & Moore 2001).

A nivel molecular, el reloj circadiano en los mamíferos consiste en bucles reguladores positivos y negativos. Los componentes positivos del reloj circadiano son CLOCK y BMAL1, que forman parte de la familia de los factores de transcripción de dominio bHLH (hélice-bucle-hélice básico) y PAS (PER-ARNT-SIM). Al unirse, forman un heterodímero en el núcleo seguido por la unión a la región *E-Box* en el promotor de sus genes diana (PER1-3, CRY 1-2, ROR α y REV-ERB α), iniciando la transcripción. Los genes diana que actúan en el bucle como retroalimentación negativa son los PER 1-3 y los CRY1-2. Durante la fase positiva del ciclo circadiano, PER1 y PER2 son principalmente proteínas citoplasmáticas, y requieren la unión a los CRY o a PER3 formando un heterodímero para la translocación nuclear. Una vez en el núcleo, el complejo PER/CRY interfiere en la transcripción inducida por BMAL1/CLOCK, modulando la expresión circadiana de las proteínas diana, completando así el ciclo (Desotelle et al. 2012).

Las modificaciones post-traduccionales juegan un papel importante en la regulación de este sistema ya que permiten la represión de la actividad BMAL1/CLOCK y restablecer el sistema a su estado original para preparar un nuevo ciclo (Desotelle et al. 2012).

A pesar de que el NSQ es el *pacemaker* principal, existen genes reloj en otras zonas del cerebro, como en el córtex cerebral y el hipocampo (Kriegsfeld et al. 2003; Dudley et al. 2003) y en algunos órganos periféricos, como son el corazón, el hígado o la piel (Zylka et al. 1998; Yamazaki et al. 2000; Schibler & Sassone-Corsi 2002; Reppert & Weaver 2002; Balsalobre 2002) y por lo tanto se consideran osciladores periféricos. El NSQ ejerce su control sobre los osciladores periféricos a través de señales neuronales y humorales (Lowrey & Takahashi 2004), generando así los ritmos.

Los NSQ reciben señales directamente desde la retina a través del tracto retinohipotalámico, formado por los axones de células ganglionares intrínsecamente fotosensibles (ipRGC). Estas células retinales contienen el fotopigmento melanopsina que responde principalmente a longitudes de onda de la banda azul (máximo a los 550 nm).

Las eferencias de los NSQ van a diversas zonas del tálamo e hipotálamo que a su vez generaran la información necesaria para generar ritmos circadianos en prácticamente todo el organismo (Leak & Moore 2001).

2.4.2. Relojes periféricos

El conocimiento actual sobre relojes periféricos, permite confirmar que estos son independientes y autosuficientes, ya que se ha comprobado su existencia en explantes, cultivos celulares y células individuales, pero dependen de la sincronización de las señales del NSQ para tener una oscilación coordinada (Geyfman & Andersen 2009).

En la piel, se ha demostrado la expresión de la proteína reloj PER1 en queratinocitos, fibroblastos dérmicos y células de melanoma, así como la oscilación circadiana en la expresión de genes reloj en la piel y la mucosa oral. En el caso de la mucosa oral, la expresión de los genes reloj se ha correlacionado con la variación circadiana en la actividad de la fase S del ciclo celular. En el caso de la piel, los osciladores están presentes en los queratinocitos epidérmicos y melanocitos, donde al parecer actúan en coordinación para producir funciones rítmicas en la piel (Geyfman & Andersen 2009).

Sandu et al. han demostrado que en la piel existe una organización circadiana compleja en la cual, cada tipo de célula alberga una maquinaria circadiana funcional y distinta. Estos mecanismos de relojería muestran períodos y relaciones de fase específicos entre los genes reloj, y estos osciladores autónomos pueden actuar a nivel local e interactuar con las señales del reloj central para hacer que las funciones de la piel sean rítmicas (Markova-Car et al. 2014).

Tanioka et al (Tanioka et al. 2009) demostraron la presencia de oscilación circadiana en la piel del ratón en condiciones de DD, lo que indica que la luz no actúa directamente en el reloj de la piel. Además, la escisión del NSQ conduce a la expresión arrítmica de los genes reloj en la piel; el gen *Dbp* que está controlado por *CLOCK* muestra una expresión constante baja. Estos resultados, que son similares a los resultados anteriores obtenidos en el hígado y el riñón, indican que el reloj de la piel está bajo la influencia de la NSQ (Markova-Car et al. 2014). No obstante, esto no significa que el NSQ dirija los relojes periféricos en las células individuales de la piel, sino que su eliminación conduce a una asincronía entre las distintas células de la piel, de forma que al medir la población total de células, parece que son arrítmicas (Geyfman & Andersen 2009).

Los genes reloj del núcleo se transcriben en el tejido de la piel humana con un período circadiano con acrofases máximas para PER1, CRY1 y BMAL1 por la mañana, tarde, y noche, respectivamente (Markova-Car et al. 2014).

2.5. Glándula pineal

Otro órgano implicado en la ritmicidad circadiana de los seres vivos es la glándula pineal. Ésta es un órgano neuroendocrino que en el ser humano está situado en la parte superior del diencéfalo, en el centro del cerebro (Moller & Baeres 2002). Esta glándula funciona como un oscilador central en muchas especies de vertebrados no mamíferos. En mamíferos, su regulación depende del NSQ y no tiene sensibilidad directa a la luz ni capacidad de generar ritmos circadianos, sino que su función es sintetizar la hormona MLT en los pinealocitos cuya función será comentada en la sección 3 (Korf et al. 1998; Fukada & Okano 2002).

2.6. Alteraciones del ritmo circadiano

Aunque los ritmos circadianos son muy estables, pueden presentar alteraciones por causas genéticas o, lo más frecuente, por determinadas circunstancias ambientales como las producidas por cambios de horarios, o por horarios anómalos en la luz o la comida. Los ritmos circadianos pueden presentar alteraciones en el período, la amplitud, la fase o la estabilidad de la fase diaria.

En humanos, la mayor parte de alteraciones de los ritmos biológicos cursan con trastornos del ciclo de sueño-vigilia, observándose en muchos casos alteraciones de la fase del ritmo (Touitou & Bogdan 2007). Hay que tener en cuenta, que la respuesta ante un cambio de fase en el ciclo de LD, puede variar en función del tejido (Yamazaki et al. 2000).

Por ejemplo, con la edad, el período intrínseco del *pacemaker* circadiano humano se acorta provocando el patrón característico de dormirse temprano y despertarse precozmente. En este caso, el tiempo total de sueño es normal y únicamente se detecta la posición adelantada del ritmo sueño/vigilia en relación con el periodo de 24 horas (Díaz & Pareja 2008).

La depresión puede cursar en muchos casos con una alteración de los ritmos biológicos (Healy & Waterhouse 1995). Por ejemplo, algunos pacientes presentan modificaciones en la amplitud y la fase de los ritmos de sueño-vigilia, los niveles de cortisol, la temperatura corporal y la secreción de MLT (Wehr et al. 1979; Rubin et al. 1992; Ford & Kamerow 1989).

No obstante, los fenómenos más frecuentes son el *Jet-lag* y el trabajo por turnos.

El *jet-lag* es la sintomatología que se produce en el individuo después de someterse a un cambio de horario y está asociado a los vuelos transmeridianos que implican el cruce de varios husos horarios. Así, se produce una desincronización entre el reloj circadiano del individuo y el reloj del nuevo lugar. La sintomatología se produce debido al proceso de resincronización al nuevo horario. El cansancio provocado por el viaje, juntamente con la adaptación horaria se traduce en una serie de síntomas tales como insomnio, fatiga, irritabilidad y disminución de la concentración (Siegel et al. 1969). Estos síntomas se deben a que el reloj circadiano tiene una velocidad de adaptación limitada para adecuarse al nuevo horario y además las distintas variables del organismo se resincronizan a distinta velocidad (Tapp & Natelson 1989). Varios estudios han demostrado que es necesario aproximadamente un día por cada hora de desfase para resincronizar los ritmos de las distintas variables del organismo (Takamura et al. 1991), por lo tanto, los síntomas van desapareciendo a medida que el reloj circadiano se ajusta a la nueva hora.

En los trabajos por turnos, el cambio continuo de horarios impide el encarrilamiento completo al ciclo externo de luz-oscuridad. Como en el caso del *jet-lag*, se produce un cambio de fase circadiana del sincronizador sin alteración del período, es decir, el organismo debe desplazar las acrofases de sus distintos ritmos con el objetivo de ajustarse al nuevo horario. Esto hace que habitualmente se produzcan síntomas como somnolencia, incapacidad para concentrarse durante las horas de trabajo, dificultad para dormir durante las horas de sueño y alteraciones metabólicas (Rajaratnam & Arendt 2001).

En ambos casos, la facilidad para ajustarse al nuevo horario dependerá de la variable, de la edad del individuo, de la manipulación del sincronizador y de su genética, entre otras. (Steinbach 1976; Mayersbach 1976; Jurado et al. 1989).

3. MELATONINA (MLT)

La melatonina (N-acetil-5-metoxitriptamina, MLT) es una neurohormona indolamínica, sintetizada y secretada principalmente por la glándula pineal, que fue descrita por primera vez por McCord y Allen en 1917 (Grace et al. 1991) y aislada por Lerner *et al.* en 1958 a partir de extractos de glándula pineal.

El NSQ controla la síntesis de melatonina a través de señales inhibitorias gabaérgicas sobre la vía que va del nucleo paraventricular del hipotálamo hasta la glándula pineal. De este modo en ausencia de luz se permite la secreción de melatonina en forma circadiana mientras que en presencia de luz se inhibe la secreción de melatonina.

Endógenamente, la MLT se sintetiza a partir del aminoácido triptófano, no sólo en la glándula pineal, sino también en tejidos tales como la retina (Grace et al. 1991) y la piel (Slominski et al. 2008), entre otros.

Tal y como se muestra en la Figura 10, la síntesis empieza con la hidroxilación del triptófano mediante la acción de la enzima TPH. En las células de la piel, este proceso está catalizado mayoritariamente por la TPH1, pero también por la TPH2. El 5-hidroxitriptófano es rápidamente descarboxilado por el aminoácido aromático descarboxilasa (AAAD). El producto, la serotonina, es acetilado por la N-acetil transferasa (NAT), que en la piel se expresa en células de la epidermis, la dermis y otros compartimentos anexos. El último paso de la síntesis de MLT tiene lugar mediante la acción de la hidroxindol O-metiltransferasa (HIOMT), que convierte la N-acetilserotonina en MLT. Esta reacción, puede ser revertida por la acción de la CYP450 (Slominski et al. 2008).

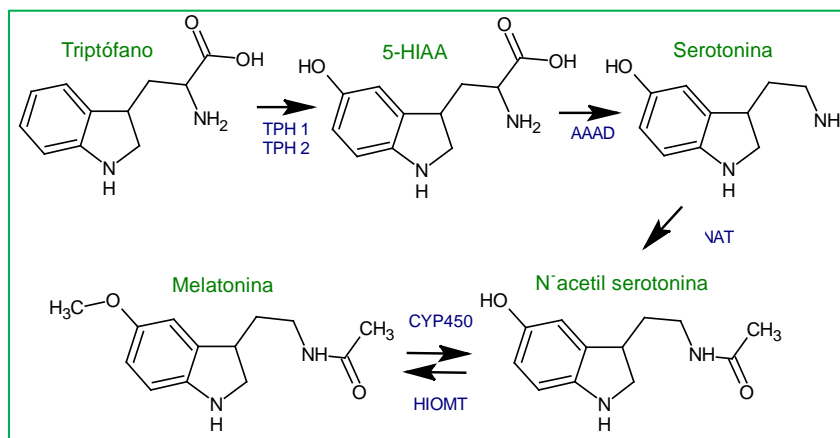


Figura 10: Proceso de síntesis de MLT en el organismo.

3.1. Mecanismos de acción

La MLT participa en el control de los ritmos circadianos, actúa sobre el sistema inmunitario y como antioxidante en procesos de estrés oxidativo.

3.1.1. Regulación de los ritmos biológicos

La glándula pineal interviene tanto en la regulación de los ritmos circadianos como en los ritmos anuales. Mediante su principal producto de secreción, la MLT, actúa como nexo de unión entre el medio ambiente luminoso y los sistemas nervioso y endocrino. Los efectos cronobióticos de la MLT están mediados principalmente por los receptores de membrana MT1 y MT2 (Dubocovich & Markowska 2005).

3.1.2. Inmunomodulación

Los efectos inmunoreguladores de la MLT representan una línea de defensa y ha sido demostrado su papel como antiinflamatorio (Sánchez et al. 2015).

La MLT ejerce una acción estimulante de la respuesta inmune mediante la activación de varios tipos celulares como los linfocitos B y T, NK, monocitos y células retículo endoteliales (Hardeland 2008) y un aumento en la producción de IL-4 en T_{CD4} de la médula ósea y las células madre de la línea granulocítica-macrofágica (Maestroni GJ, Covacci V 1994). Otros autores han descrito que la MLT estimula la secreción de IL-1, IL-6 e INF α (Barjavel et al. 1998).

Los metabolitos AFMK y AMK (que se verán en detalle en la sección 4.3.3.1) también tienen propiedades antiinflamatorias e inmunoreguladoras. El AFMK inhibe el TNF- α y la IL-8; el AMK inhibe la síntesis de las prostaglandinas (Kelly et al. 1984) y ambas moléculas inhiben la expresión génica de la COX-2 (Mayo et al. 2005).

3.1.3. Antioxidante

Los efectos antioxidantes de la MLT ocurren como mínimo a través de 2 mecanismos. El primer mecanismo es su efecto como antioxidante directo, ya que depura los radicales libres (Vijayalaxmi et al. 2004). El segundo mecanismo es el incremento de la actividad de las enzimas antioxidantes. Esto provoca un incremento en la capacidad de defensa

antioxidante endógena e induce la sobrerregulación de la expresión génica, aumentando la primera línea de defensa contra el daño oxidativo de las células (Barlow-Walden et al. 1995; Rodriguez et al. 2004).

Para hablar de la capacidad antioxidante, es necesario primero definir qué son los radicales libres y cómo se forman.

3.1.3.1. Radicales libres

Los radicales libres son especies químicas neutras o con carga cuya cubierta externa contiene un electrón desapareado (Fridovich 1978). Para alcanzar la estabilidad molecular, los radicales libres tienden a reaccionar con otras moléculas cercanas, cediendo o captando electrones para compensar ese orbital incompleto, a expensas de desestabilizar la configuración electrónica de las moléculas con las que reacciona, convirtiéndolas a su vez en especies reactivas y pudiendo desencadenar reacciones en cadena (Halliwell 1993).

Los radicales libres más abundantes son el O_2 y los productos derivados de su reducción incompleta, como el $\bullet O_2^-$, el H_2O_2 , el 1O_2 y el radical $\bullet OH$. Todos estos forman el grupo de los radicales libres derivados del oxígeno o ROS, pero existen radicales que se forman a partir de moléculas distintas, como el carbono (RCS) o el nitrógeno (RNS).

Los radicales libres pueden proceder de fuentes metabólicas endógenas o de agresiones oxidativas externas. Entre las fuentes endógenas destacan las mitocondrias, los peroxisomas (del Rio et al. 1992), la síntesis de prostaglandinas y la xantina deshidrogenasa. Las agresiones oxidativas externas más comunes son las radiaciones ionizantes (rayos X y rayos γ) (Scholes 1983) y UV (Pillai et al. 2005), los agentes antineoplásicos, como por ejemplo, la doxorubicina, el cisplatino, el carboplatino y el irinotecán, entre otros (Fuchs-Tarlovsky 2013) y los factores ambientales, como por ejemplo, los contaminantes aéreos fotoquímicos, los pesticidas, el humo del tabaco, los solventes e hidrocarburos aromáticos.

3.1.3.2. Eliminación de radicales libres

La reacción de la MLT con los radicales libres se produce en todos los compartimentos del organismo debido a su anfifilia y su consiguiente capacidad de distribución. Reacciona directamente con $\bullet\text{OH}$, H_2O_2 , ONOO^- , HClO , $^1\text{O}_2$ y $\bullet\text{O}_2^-$, obteniendo los metabolitos definidos en la Figura 16 y descritos en la sección 4.3.3.4.

Los radicales libres son los responsables principales de la peroxidación lipídica, la oxidación proteica, la activación y liberación de la caspasa, la apoptosis, la inestabilidad mitocondrial y el daño en el DNA. Por lo tanto, cuando actúa eliminando los radicales libres, actúa indirectamente reduciendo estos procesos (Fischer et al. 2004; Luchetti et al. 2009; Fischer et al. 2001; Cho et al. 2007).

3.1.3.3. Mejora de la capacidad de defensa antioxidante endógena

La MLT es capaz de estimular la actividad y la expresión de otros sistemas antioxidantes, estableciendo así una forma de reducción del estrés oxidativo mediante una acción indirecta (Antolín et al. 2002; Mayo et al. 2002).

En primer lugar, estimula el ciclo del glutatión. La MLT sobrerregula la actividad de la GPx, lo que reduce el H_2O_2 a agua (Barlow-Walden et al. 1995; Pablos et al. 1995) equilibrando la balanza de GSSG/GSH (Maci et al. 2000) y la GRd.

También aumenta la producción de glutatión mediante la estimulación de la γ -glutamylcisteína sintasa, que es una enzima limitante en la vía de síntesis de glutatión (Urata et al. 1999), y estimula la G6PDH, que es la responsable de la producción de NADPH que requiere la GRd (Pierrefiche & Laborit 1995). La MLT también estimula otras enzimas antioxidantes como la SOD y la catalasa (Antolin et al. 1996; Leon et al. 2004).

Por último, la MLT inhibe la activación del factor nuclear NFkB (Sainz et al. 2008). El NFkB, que es inducido por ROS, es un acontecimiento central y temprano en la inducción de las reacciones inflamatorias (Fuchs et al. 2001) y activa múltiples genes diana implicados en la expresión de varios mediadores proinflamatorios. Al ser inhibido por la acción de la MLT, estos mediadores no se forman y por tanto se produce una protección celular.

En la Figura 11 se encuentran representados los distintos lugares de acción antioxidante de la MLT.

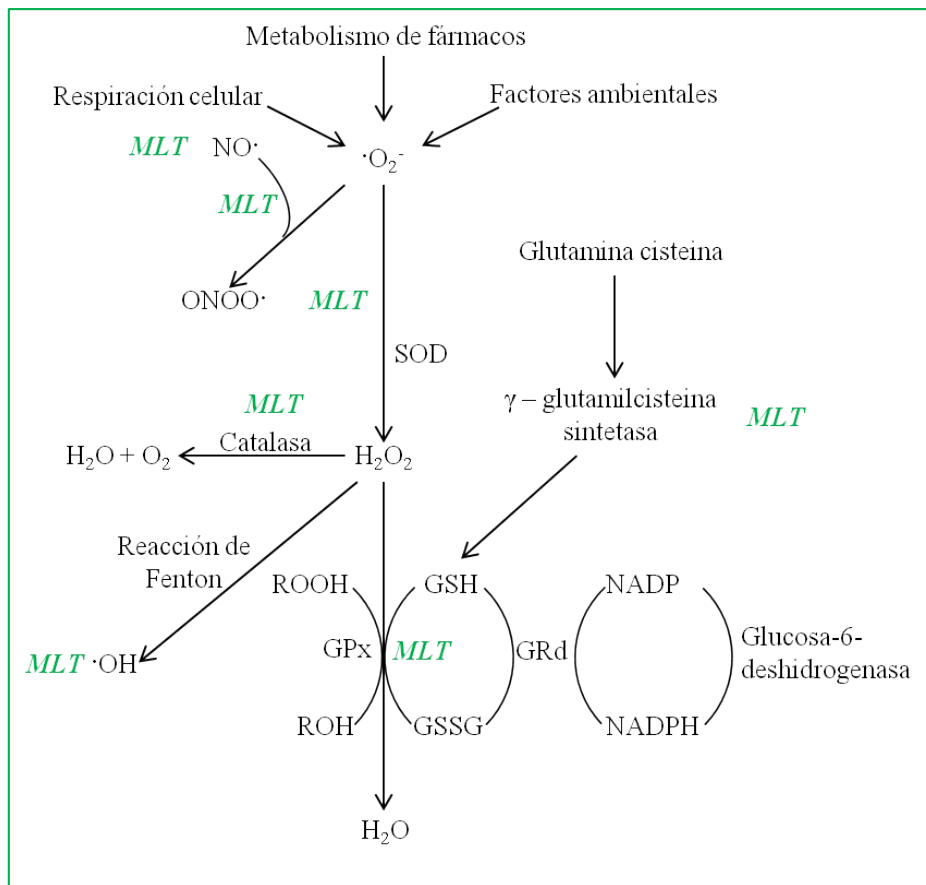


Figura 11: Acciones directas e indirectas de la MLT en su papel como antioxidante.

3.2. Administración exógena de MLT: usos

3.2.1. MLT en la alteración de los ritmos biológicos

La administración exógena de MLT sincroniza, en humanos, los ritmos de temperatura, sueño/vigilia y el de la MLT endógena (Cassone et al. 1986; Reiter 1993). Por este motivo, la MLT se utiliza para regular los ritmos de sueño en casos de insomnio tanto primario como secundario.

La MLT se ha utilizado con éxito en pacientes con insomnio primario. La administración de 2 mg diarios desde 3 semanas hasta 3 meses disminuye la latencia del sueño, la calidad subjetiva del sueño y la funcionalidad diurna, sin síntomas de abstinencia ni insomnio de rebote (Agency 2014).

En el caso de insomnios secundarios, la MLT es útil para contrarrestar el *jet-lag* y los síndromes de adelanto y retraso de fase. También es eficaz para mejorar el sueño en pacientes ancianos con niveles bajos de esta hormona (Díaz & Pareja 2008).

3.2.2. MLT en las patologías de oxidación

3.2.2.1. MLT y cáncer

Los radicales libres, al acumularse, pueden conducir a mutaciones en el material genético de las células, lo que puede provocar la transformación de una célula sana en una cancerosa. Las células cancerosas se dividen sin control y se produce un desequilibrio entre la proliferación y la muerte celular (Federico et al. 2007). Los mediadores y efectores celulares de la inflamación tienen acción promotora de los tumores, actuando en la proliferación y supervivencia de las células malignas, la angiogénesis y la metástasis. Además alteran la respuesta a hormonas y agentes quimioterapéuticos (Mantovani et al. 2008). Entre las moléculas implicadas en el vínculo entre la inflamación y el cáncer se incluyen factores de transcripción, como el Nrf2 y el NFκB, activadores de la transcripción 3 y algunas citocinas inflamatorias, como por ejemplo, IL-1β, IL-6, IL-23 y TNF-α.

Todo lo anterior se produce a nivel sistémico, afectando también a la piel, lo que le provoca sequedad, descamación, irritación, prurito y erupciones cutáneas por la deslipidación de las membranas y la muerte celular (Di Franco et al. 2013; Dirier et al. 2007; Faithfull & Wells 2003).

La MLT, como se ha comentado anteriormente, puede actuar estimulando el sistema antioxidante endógeno o como antioxidante *per se*. Por lo tanto, esta molécula puede usarse como coadyuvante en el tratamiento del cáncer y como anticancerígeno.

Los tratamientos quimioterápicos inducen estrés oxidativo en los sistemas biológicos. Producen un aumento de la peroxidación lipídica, una reducción de la capacidad sanguínea para depurar radicales libres, una disminución de los niveles plasmáticos de antioxidantes como la vitamina E, vitamina C y β-caroteno, y una marcada reducción de los niveles de glutatión (Faber et al. 1995; Ladner et al. 1989; Clemens et al. 1990; Faure et al. 1996; Weijl et al. 1998).

Las radiaciones ionizantes administradas en los tratamientos con radioterapia, igual que los quimioterápicos, generan radicales libres, que reaccionan con el DNA, RNA, proteínas y lípidos de células tumorales y sanas, causando su disfunción y provocando la muerte celular (Scholes 1983). Por este motivo se aconseja el uso de radioprotectores que depuren los radicales libres, como es el caso de la MLT (Nair et al. 2001; Vijayalaxmi et al. 2004; Kim et al. 2001).

Numerosos estudios clínicos han incorporado la MLT en el tratamiento del cáncer, solo o en asociación con quimioterápicos o radioterápicos, con el objetivo de reforzar la eficacia de estos tratamientos, reducir los efectos secundarios, aumentar la supervivencia o mejorar la calidad de vida de los pacientes. Esta sustancia, debido a su actividad antioxidante y promotora de la formación de otros antioxidantes, impide que los tumores afecten a las células normales y por consiguiente, limita las lesiones oxidativas sobre el ADN, los lípidos, los aminoácidos y las proteínas (Dopfel et al. 2007; Cos et al. 2006). En los tratamientos oncológicos convencionales, la MLT puede ayudar a inhibir la proliferación de ciertas células cancerígenas y luchar contra los efectos secundarios tóxicos de la quimioterapia y radioterapia (Mills et al. 2005; Lissoni et al. 2003; Padillo et al. 2010; Ruiz-Rabelo et al. 2007; Badr et al. 1999).

La MLT ha demostrado su capacidad para inhibir el crecimiento de células de cáncer en numerosos estudios y a través de diferentes mecanismos de acción, incluyendo antiproliferativo, antioxidante y los efectos inmunoestimulantes.

Inhibe la expresión de ARNm endotelina-1, que es el primer paso en la síntesis de endotelina-1, la expresión de la enzima convertora de endotelina-1 y la liberación de endotelina-1 a partir de células de cáncer colorrectal *in vitro*. La inhibición de la expresión de edn-1 se debe a la inactivación de FoxO1 y del factor de transcripción NFkB (Leon et al. 2004). La MLT también modula la expresión génica y la sobreexpresión de TNF- α (Haddadi & Fardid 2015).

Otro mecanismo por el cual la MLT inhibe el crecimiento celular del cáncer es la disminución en la expresión de la telomerasa en las células tumorales MCF-7. La telomerasa es la enzima responsable del alargamiento de los telómeros que se activa en la mayoría de los cánceres humanos (Leon-Blanco et al. 2003). Además, una vez se forman los tumores, la MLT también puede controlar su crecimiento. En las células de hepatoma,

la MLT inhibe la absorción y el metabolismo de los ácidos grasos, incluyendo el ácido linoleico, y su conversión en la molécula ácido 13-hidroxiocetadecadienoico de señalización mitogénica (Blask et al. 2004).

3.2.2.2. MLT y radiación solar

En el Anexo 1 de la presente tesis, se recoge el resumen y referencia del capítulo *The role of antioxidants in sunscreens: the case of Melatonin*, que forma parte del libro *Sunscreens, Properties, Role in Skin Cancer Prevention and Health Effects*. En éste capítulo, se hace una extensa revisión sobre los efectos nocivos producidos por la radiación ultravioleta, visible e IR en el organismo.

Diversos estudios han demostrado los efectos beneficiosos de la MLT para contrarrestar los efectos nocivos de la radiación UV (Scheuer et al. 2014), otorgando a esta molécula una potencial actividad como fotoprotectora.

Por ejemplo, la aplicación de la MLT reduce el eritema (Bangha et al. 1996; Bangha et al. 1997) y la apoptosis celular (Luchetti et al. 2006) inducidas por la radiación UV de forma dosis dependiente (Becker-Andre et al. 1994) cuando se aplica antes de la exposición a radiación UV y a una concentración mínima del 0,5% (Dreher et al. 1999). También previene la reducción de la viabilidad celular y la tasa de síntesis de ADN provocada por esta radiación (Lee et al. 2003; Fischer et al. 2006; Nickel & Wohlrab 2000; Luchetti et al. 2009).

Como se ha mencionado anteriormente, la radiación UV genera ROS y en consecuencia estrés oxidativo que posteriormente conduce a daño oxidativo del ADN y la MLT actúa como un potente depurador de radicales libres, no sólo por sí mismo, sino también por la acción de sus metabolitos (Fischer et al. 2004; Luchetti et al. 2009; Fischer et al. 2001; Cho et al. 2007).

4. CRONOFARMACOCINÉTICA

4.1. Introducción a la farmacocinética

La farmacocinética es la rama de la farmacología que se encarga del estudio de los procesos a los que es sometido un fármaco a través de su paso por el organismo.

La administración de un fármaco, en una forma farmacéutica determinada, implica su paso por una serie de procesos cinéticos, conocidos con el acrónimo LADME, Liberación, Absorción, Distribución, Metabolismo y Excreción (Doménech-Berrozpe et al. 1997).

La acción farmacológica de un fármaco depende de la cantidad de éste que es capaz de llegar al lugar de acción. La cuantificación de la sustancia en el lugar de acción es difícil de realizar y por eso, se acepta la existencia de una relación entre la acción farmacológica de un fármaco y sus concentraciones plasmáticas.

Los estudios farmacocinéticos se basan en la determinación y representación gráfica de las concentraciones del fármaco en fluidos o tejidos biológicos tras su administración y durante un tiempo determinado. Debido a que los seres vivos son sistemas complejos, resulta complicado establecer relaciones cuantitativas entre la dosis administrada, la concentración en los distintos tejidos y el tiempo transcurrido. Por este motivo, para describir la evolución del fármaco en el organismo en el tiempo, se recurre a modelos farmacocinéticos, así, mediante ecuaciones matemáticas se estudian las velocidades de los procesos de absorción, distribución y eliminación del fármaco.

Existen dos clases de modelos farmacocinéticos, los no compartimentales y los compartimentales. Para el modelo compartimental, se asume que los procesos de absorción, distribución y eliminación que tienen lugar siguen una cinética de orden uno.

En el **modelo no compartimental** o modelo-independiente, el tratamiento de los datos permite estimar los parámetros farmacocinéticos sin necesidad de ajustarlos a un modelo determinado. Este es el tipo de análisis que se realiza para los estudios de bioequivalencia, en los que se requiere la determinación del AUC_0^∞ , la C_{max} y t_{max} (Doménech et al. 2013).

El desarrollo del tratamiento farmacocinético no compartimental consiste en (1) diseño del experimento (2) obtención de los datos experimentales (3) asunción del modelo de disposición de la fase terminal (4) estimación de los parámetros farmacocinéticos.

Se basa en la disposición del fármaco en la fase terminal de la curva de niveles plasmáticos, sin que sea necesario establecer ninguna interrelación entre el fármaco y el sustrato biológico sobre el que se encuentra (Doménech et al. 2013). El tratamiento no compartimental permite el cálculo de los siguientes parámetros farmacocinéticos:

- *Pendiente de la fase monoexponencial terminal* de la curva que relaciona el logaritmo de los niveles plasmáticos de fármaco frente al tiempo (λ_z). λ_z equivale en valor absoluto a la constante de velocidad que rige el proceso. Es posible estimarla mediante regresión lineal simple de los logaritmos de las concentraciones plasmáticas de fármaco, frente al tiempo correspondiente a la fase monoexponencial de la curva de niveles plasmáticos (Ecuación 2) (Doménech et al. 2013).

$$\ln C = -\lambda_z \cdot t + \ln C_0 \quad (\text{Ecuación 2})$$

- *Semivida biológica* ($t_{1/2 \lambda_z}$). Equivale al cociente entre el logaritmo neperiano de 2 y el valor de la pendiente de la fase monoexponencial terminal de la curva de niveles plasmáticos de fármaco. Se expresa en unidades de tiempo (Ecuación 3).

$$t_{\frac{1}{2} \lambda_z} = \frac{\ln 2}{\lambda_z} \quad (\text{Ecuación 3})$$

- *Área bajo la curva de niveles plasmáticos*, de 0 a infinito (AUC_0^∞). Los métodos más utilizados son el trapezoidal, el logotrapezoidal y el mixto. Utilizando el método de los trapecoides, el área total bajo la curva desde un tiempo 0 hasta infinito corresponde a la suma de las áreas de todos los trapecios (Ecuación 4).

$$AUC_0^\infty = AUC_0^t + \frac{C_t}{\lambda_z} \quad (\text{Ecuación 4})$$

Donde AUC_0^t es el area bajo la curva de concentración plasmática-tiempo hasta el último punto de tiempo medible y C_t la última concentración medible desde 0.

- *Tiempo medio de residencia* (MRT). Es el tiempo que en promedio permanece en forma inalterada una molécula de fármaco en el organismo. Se puede calcular usando la ecuación 5.

$$MRT = \frac{AUMC_0^\infty}{AUC_0^\infty} \quad (\text{Ecuación 5})$$

Donde $AUMC_0^\infty$ corresponde al valor del área bajo la curva que se obtiene al relacionar en papel milimetrado, la concentración por el tiempo frente al tiempo.

- *Aclaramiento plasmático* (CL_p). Es el volumen de sangre o plasma que es depurado de un fármaco por unidad de tiempo mediante procesos de eliminación. Se expresa en volumen por unidad de tiempo (L/h o ml/min). Se puede calcular según la ecuación 6.

$$CL_p = \frac{D}{AUC_0^\infty} \quad (\text{Ecuación 6})$$

Donde D es la dosis de fármaco administrada.

- *Volumen de distribución* (V_d). En el modelo no compartimental, el V_d calculado según la ecuación 7 es la forma más fiable de calcular el V_d del fármaco en el organismo.

$$V_d = \frac{D}{AUC_0^\infty \cdot \lambda_z} \quad (\text{Ecuación 7})$$

En los **modelos compartimentales**, el concepto de compartimento no es un concepto anatómico sino cinético, que engloba todas las zonas del organismo que poseen propiedades cinéticas parecidas y en las que se supone una distribución uniforme del fármaco (Doménech-Berrozpe et al. 1997).

De esta forma, un compartimento se define por sectores acuosos con un volumen determinado (V_d), que contienen una determinada cantidad de fármaco (Q), de forma que la concentración en este compartimento viene dada por la ecuación 8.

$$C = \frac{Q}{V_d} \quad (\text{Ecuación 8})$$

Debido a que el organismo es muy complejo y podrían llegar a contabilizarse muchos compartimentos distintos, en la práctica se tiende a considerar el organismo constituido

por el número menor de compartimentos posibles que permitan hacer una descripción adecuada del comportamiento cinético del fármaco (Doménech-Berrozpe et al. 1997).

Los modelos farmacocinéticos lineales que más habitualmente se usan para describir los fármacos son los modelos monocompartimental y bicompartimental.

El modelo monocompartimental es el más simple y representa al organismo como un único compartimento. Según este modelo la distribución del fármaco en el organismo es instantánea y uniforme, con una eliminación desde tiempo 0. La Figura 12 representa el esquema del modelo suponiendo la administración de un bolus IV.

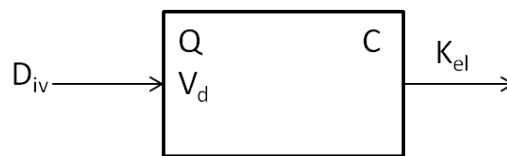


Figura 12. Representación esquemática del modelo monocompartimental suponiendo la administración de bolus IV.

La ecuación 9, representa las variaciones en las cantidades de fármaco en función el tiempo para el modelo monocompartimental.

$$\frac{dQ}{dt} = -K_{el} \cdot Q \quad (\text{Ecuación 9})$$

Donde, K_{el} es la constante de eliminación del fármaco.

En el caso de una administración extravasal, el modelo debe considerar el proceso de absorción del fármaco tal y como muestra la Figura 13 y Ecuación 10.

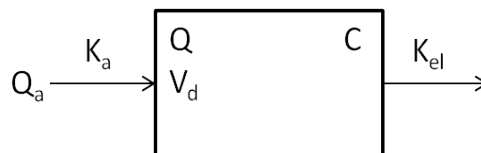


Figura 13. Representación esquemática del modelo monocompartimental Suponiendo una administración extravasal.

$$\frac{dQ}{dt} = K_a \cdot Q - K_{el} \cdot Q \quad (\text{Ecuación 10})$$

Donde, K_a es la constante de absorción.

Para este modelo la cantidad de fármaco existente en el organismo a un tiempo determinado (Q) viene dado por la Ecuación 11.

$$Q = Q_0 \cdot e^{K_{el} \cdot t} \quad (\text{Ecuación 11})$$

Donde, Q_0 es la cantidad de fármaco a tiempo 0.

Si consideramos una administración IV en dosis única, Q_0 es igual a la dosis administrada (D) y la ecuación se puede escribir de la siguiente forma:

$$Q = D \cdot e^{K_{el} \cdot t} \quad (\text{Ecuación 12})$$

En este modelo, la concentración de fármaco en el organismo (C) a cualquier tiempo, se puede conocer a partir del cociente entre la cantidad de fármaco en ese instante (Q) y el volumen acuoso en el que se encuentra distribuido (V_d) está definido por la Ecuación 13:

$$C = \frac{D}{V_d} \cdot e^{K_{el} \cdot t} \quad (\text{Ecuación 13})$$

En un modelo monocompartimental lineal, al aumentar la D, aumenta proporcionalmente el valor de C_0 , pero no se modifica la K_{el} . A menor valor de semivida biológica de eliminación ($t_{1/2K_{el}}$), mayor es la pendiente de la curva concentración-tiempo, ya que $t_{1/2}$ es inversamente proporcional a la K_{el} . El V_d representa el volumen acuoso del organismo en el cual es capaz de distribuirse el fármaco. En el caso de que V_d sea constante, a mayor aclaramiento (CL) mayor es la pendiente de la curva y por tanto mayor es la K_{el} . Si el V_d se modifica, al administrarse una misma dosis, la concentración se modificará.

Debido a que los mamíferos tienen una complejidad anatómico-fisiológica elevada, casi ningún fármaco se ajusta a un modelo monocompartimental, ya que la distribución no es habitualmente instantánea ni uniforme tras su administración. Por eso, para describir el comportamiento de la mayoría de los fármacos acostumbra a ser necesario un modelo más complejo que el monocompartimental.

El modelo cinético bicompartimental asume que la distribución del fármaco no es instantánea y que los tejidos que tienen un mayor aporte sanguíneo, alcanzan más rápidamente el equilibrio de distribución que los que tienen menor aporte. Partiendo de esta premisa, se distinguen por tanto el compartimento central, que lo componen los tejidos en los que el equilibrio de distribución se produce rápidamente y un

compartimento periférico, que lo componen los tejidos en los que tarda más tiempo en alcanzarse el equilibrio de distribución (Doménech-Berrozpe et al. 1997).

En la Figura 14 está representado el esquema de este modelo para una administración IV.

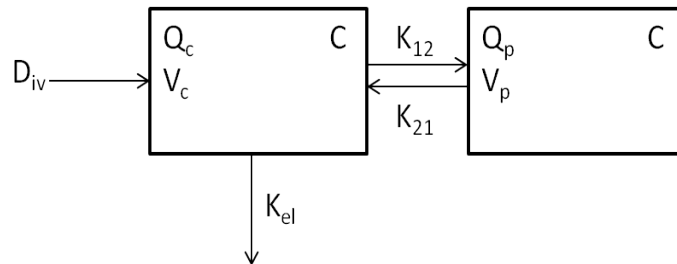


Figura 14. Representación esquemática del modelo bicompartimental suponiendo la administración de un bolus IV.

La Ecuación 14, muestra la ecuación del modelo bicompartimental de un bolus IV que describe las variaciones en las cantidades de fármaco en el compartimento central en función el tiempo.

$$\frac{dQ_C}{dt} = K_{21} \cdot Q_P - K_{12} \cdot Q_C - K_{el} \cdot Q_C \quad (\text{Ecuación 14})$$

Donde K_{12} es la constante de distribución del fármaco desde el compartimento central al compartimento periférico y K_{21} es la constante de retorno desde el compartimento periférico al central.

Si consideramos una administración extravasal del fármaco, el modelo y su ecuación son las siguientes (Figura 15 y Ecuación 15).

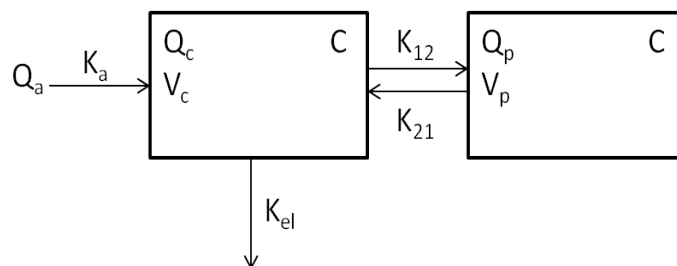


Figura 15. Representación esquemática del modelo bicompartimental suponiendo una administración extravasal.

$$\frac{dQ_C}{dt} = K_a \cdot Q_a + K_{21} \cdot Q_P - K_{12} \cdot Q_C - K_{el} \cdot Q_C \quad (\text{Ecuación 15})$$

Tal y como se ha comentado, el modelo bicompartimental asume la existencia de un desfase en la distribución del fármaco en el organismo tras su administración. Este modelo considera que el organismo está formado por dos compartimentos intercomunicados a los que el fármaco puede llegar, uno es el compartimento central, de fácil acceso, y el otro el periférico, en el cual tarda más en llegar el fármaco.

En resumen, cuando el fármaco se administra por vía IV, éste se distribuye instantáneamente en el compartimento central. Desde el cual, regido por una constante de distribución, pasa al compartimento periférico. De este compartimento periférico, el fármaco también puede volver al central, regido por una constante de retorno. Por otro lado, se considera que la eliminación del fármaco se produce principalmente desde el compartimento central, regida en este caso por una constante de eliminación. Por lo tanto, el fármaco desaparece del compartimento central a través de dos mecanismos, por la distribución de éste al compartimento periférico y por su eliminación. En conjunto a estos 2 mecanismos se les conoce como proceso de disposición (Doménech-Berrozpe et al. 1997).

La gráfica que se obtiene tras la representación de las concentraciones-tiempo, presenta un primer tramo curvo, seguido por una de la fase terminal recta. El primer tramo corresponde a los procesos de eliminación y distribución del fármaco tras su administración, la fase terminal corresponde al equilibrio de distribución, que es el momento en el que se equiparan los procesos de retorno y distribución y prácticamente sólo se produce eliminación. La ecuación matemática que correlaciona la concentración-tiempo en el compartimento central se describe en la Ecuación 16.

$$A = A_0 \cdot e^{-\alpha \cdot t} + B_0 \cdot e^{-\beta \cdot t} \quad (\text{Ecuación 16})$$

Donde α y β son las macroconstantes de disposición (α – rápida y β – lenta), en las que se asume que α rige principalmente el proceso inicial de distribución y en menor medida el proceso de eliminación y β rige mayoritariamente el proceso de eliminación y en menor grado el proceso de distribución.

Hay que tener en cuenta que los volúmenes de los compartimentos en los modelos compartimentales son volúmenes aparentes, no reales. Para el modelo bicompartimental hay 2 volúmenes, el del compartimento central (V_c) y el del periférico (V_p), la suma de

los cuales representa el V_d total del organismo. Cuando se alcanza el equilibrio de distribución, el V_d se denomina volumen de distribución en equilibrio estacionario (V_{dss}).

Cuando el fármaco es administrado por vía extravasal, hay que tener en cuenta que una porción determinada de fármaco puede no liberarse de su forma farmacéutica, o bien no absorberse por completo o sufrir el efecto de primer paso hepático. Por este motivo, cuando un fármaco se administra por una vía distinta a la IV, es importante determinar su biodisponibilidad. La biodisponibilidad se define como un parámetro biofarmacéutico que cuantifica la disponibilidad fisiológica de un fármaco determinado en la biofase o lugar de acción y depende de la formulación que lo contiene, de factores inherentes a la propia sustancia, como por ejemplo sus propiedades fisicoquímicas o sus características farmacocinéticas y del sustrato biológico al que va destinado. Para poder calcular la biodisponibilidad, es necesario disponer de los datos de la vía IV.

Por lo tanto, la vía de administración, la forma farmacéutica usada y las características fisicoquímicas del fármaco son determinantes en este proceso cinético, pero tal y como se ha comentado anteriormente, las funciones del organismo no son constantes sino que varían siguiendo ritmos biológicos. Por lo tanto, es importante estudiar la farmacocinética de los fármacos incluyendo como variable de estudio el momento del ciclo biológico en el que se encuentra el organismo. Esto se conoce con el nombre de Cronofarmacocinética. La mayor parte de variables que influyen en el ADME tienen ritmos circadianos, sincronizados con el *zeitgeber* luz-oscuridad.

La cronofarmacocinética es, por lo tanto, una ciencia situada entre la cronobiología y la farmacocinética, que se encarga del estudio de los cambios rítmicos de las variables del organismo, que influyen en como los fármacos se absorben, se distribuyen, se metabolizan y se excretan en función del momento del ciclo biológico en el cual son administrados (Halberg & Halberg 1984; Cadorniga 1990).

Tras la administración de una sustancia en el organismo, su efecto farmacológico dependerá de la concentración o cantidad de sustancia libre que sea capaz de llegar al lugar de acción. Si tal y como se ha comentado, todas las funciones del organismo se rigen por un patrón rítmico, en función de la amplitud de esta variable, la cantidad de fármaco libre disponible para ejercer su acción puede ser diferente en función de la hora a la que el fármaco es administrado (Halberg & Halberg 1984; Cadorniga 1990).

4.2. Cronofarmacocinética en ADME

En relación al ADME, se ha demostrado la existencia de ritmos circadianos en cada uno de los 4 procesos que determinan la disposición de más de 300 fármacos en roedores y en humanos (Levi & Schibler 2007). Por lo tanto, la cronofarmacocinética determina los patrones de exposición de los tejidos diana a las formas activas de un fármaco, independientemente de la clase y la vía de administración (oral, transdérmica o transmucosa (excepto la rectal), intraperitoneal e intravenosa), la vida media de eliminación, o el horario de la administración de una dosis única o múltiple (Levi & Schibler 2007).

A continuación se resumen las principales características cronofarmacocinéticas de cada una de las fases de ADME, así como los factores que las afectan.

Es importante tener en cuenta, que no todos los fármacos se ven afectados por las variaciones circadianas en el ADME, y en otros casos la afectación no es suficiente para ver diferencias en las acciones farmacológicas, por este motivo, es importante estudiar la cronofarmacocinética de cada fármaco.

4.2.1. Absorción

La absorción, tal y como se ha comentado en la sección 1.2.2, es el proceso por el cual el fármaco pasa a través de las membranas biológicas hasta llegar a la circulación sistémica.

En el caso de la absorción gastrointestinal, existen diversos parámetros digestivos que presentan variaciones circadianas en humanos (Tamargo 2005).

- *Perfusión de la mucosa gástrica.* Varía a lo largo del día, siendo mayor entre la medianoche y las primeras horas de la mañana.
- *Vaciamiento gástrico de los alimentos y motilidad gastrointestinal.* Son más rápidos por la mañana.
- *Secreción gástrica ácida.* Alcanza sus mayores valores al final de la tarde.

Los ritmos circadianos de estas variables influyen en la absorción de fármacos por vía oral. Por ejemplo, el hecho de que por la mañana (8 - 12 am) haya un vaciado gástrico

más elevado hace que los fármacos se absorban antes y que cuando se administran a las 7 pm, el t_{\max} se prolongue un 67%. La mayor motilidad intestinal por la mañana hace que los fármacos que requieren alcanzar el intestino delgado para ser absorbidos, tengan un t_{\max} inferior cuando se administran por la mañana (Tamargo 2005).

En el caso de la absorción transdérmica, no hay tanta literatura disponible como para la vía oral. No obstante, las variables rítmicas de la piel que pueden influir en la absorción son:

- *Temperatura.* Tal y como se ha comentado en la sección 1.2.3.1, un aumento de la temperatura provoca un aumento en la permeabilidad de la piel y consecuentemente en la permeación y absorción de los fármacos. De esta forma, el ritmo circadiano de temperatura cutánea, descrito en la literatura (Yosipovitch et al. 1998), puede influir en el paso de los fármacos administrados en la piel.
- *pH.* Se ha descrito la existencia de ritmos circadianos en el pH de la piel (Yosipovitch et al. 1998) y según la sección 1.2.3.1, el pH puede afectar a la magnitud de disociación del principio activo y, por lo tanto, a su capacidad de permeación a través de la membrana. Por lo tanto, para las moléculas ionizables, el pH puede hacer variar la permeación de éstas a través de la piel.
- *Hidratación.* Para esta variable, existen ciertas discrepancias en la literatura, ya que algunos autores no han podido demostrar el ajuste de los datos de hidratación de la piel a una función rítmica (Yosipovitch et al. 1998) y sin embargo, otro sí lo han demostrado (Bolzinger et al. 2012). No obstante, en el caso de que los haya, tal y como se ha descrito en la sección 1.2.3.1, podría influir en la permeación de los fármacos a través de la piel

4.2.2. Distribución

La distribución es el proceso de transferencia reversible del fármaco desde la sangre a distintas estructuras extravasculares del organismo (órganos, tejidos y fluidos).

Los factores que modifican la distribución de un fármaco en el organismo son:

- Propiedades fisicoquímicas del fármaco

- Afinidad del fármaco por los tejidos
- Fijación a proteínas plasmáticas
- Flujo sanguíneo a los tejidos
- Permeabilidad de las membranas

En la práctica clínica, sólo las propiedades fisicoquímicas del fármaco se mantienen constantes, el resto, se modifican en función de las características fisiopatológicas (Doménech et al. 2013). En estado fisiológico, se ha demostrado la presencia de ritmos circadianos en el flujo sanguíneo, la fijación a proteínas plasmáticas y en la permeabilidad de las membranas, por lo que en función de la hora del día, la distribución del fármaco puede ser distinta (Tamargo 2005).

Por ejemplo, en roedores, el % de unión a proteínas plasmáticas es máximo durante la fase actividad del animal, lo que se traduce en una disminución de un 18% de la fracción libre de carbamacepina en esta fase. Las diferencias en la unión a proteínas plasmáticas pueden tener relación con la tasa de efectos secundarios, por ejemplo, el cisplatino con acrofase a las 4 pm, tiene variaciones en la unión a proteínas plasmáticas de un 11%.

También los niveles de flujo sanguíneo son máximos durante la fase de actividad en esta especie animal, lo que facilita la distribución de los fármacos. Esto se traduce en volúmenes de distribución y también de aclaramiento más elevados en la fase de actividad para algunos fármacos, como es el caso de la disopiramida (Tamargo 2005).

4.2.3. *Metabolismo*

Muchos fármacos se metabolizan a nivel hepático, y en general, este metabolismo depende de la actividad enzimática del hígado y del flujo sanguíneo. Para los fármacos con una elevada tasa de extracción hepática, el metabolismo depende del flujo sanguíneo hepático, para aquellos con una tasa de extracción hepática baja, depende de la actividad enzimática del hígado. Tanto el metabolismo como el flujo sanguíneo hepático están influenciados por ritmos circadianos. Las variaciones en el flujo sanguíneo hepático inducen cambios en la perfusión hepática y en la variación temporal del aclaramiento de los fármacos eliminados principalmente por extracción hepática (Baraldo 2008).

Los niveles de CYP450 hepático, responsables del metabolismo de fase I de muchos fármacos, fluctúan siguiendo un ritmo circadiano. También lo hacen algunas de las

enzimas responsables del metabolismo de fase II, tales como la glutatión S-transferasa y la carboxilesterasa. Por lo tanto, aquellos fármacos que se metabolizan mediante la acción de estas enzimas, podrán presentar diferencias en función de la hora del día a la que son administrados (Baraldo 2008).

Los ritmos metabólicos hepáticos dependen del reloj biológico interno, que está sincronizado al ritmo de ciclo oscuridad externo. No obstante, los tejidos hepáticos y el hígado en sí, también tienen relojes biológicos intrínsecos capaces de generar ritmos diurnos (Baraldo 2008).

4.2.4. Excreción

La excreción es el conjunto de procesos por medio de los cuales un fármaco o sus metabolitos son expulsados al exterior del organismo. Esta excreción se puede realizar por diferentes vías: renal, biliar o glandular. La más importante no obstante, es la excreción renal (Doménech et al. 1998). Aunque el fármaco se elimine mediante metabolismo, tiende a generar metabolitos más polares que utilizan la excreción renal para salir del organismo.

La filtración glomerular, el flujo sanguíneo renal, el pH urinario y la resorción tubular presentan ritmos circadianos. Los fármacos más afectados son los hidrófilos, que suelen excretarse inalterados (Baraldo 2008).

En el caso de fármacos que presentan intercambios muy rápidos entre compartimentos y semividas de eliminación cortas, la hora del día a la que se administra el fármaco puede tener una gran influencia en su cinética en el organismo.

4.3. Farmacocinética de la MLT

Los parámetros farmacocinéticos de la MLT presentan una gran variabilidad, no sólo en humanos sino también en el resto de especies estudiadas. De forma endógena, debido a que la MLT se metaboliza muy rápidamente, debe producirse de forma continuada durante la noche. En las personas con un ritmo circadiano saludable, los niveles de MLT aumentan rápidamente después del anochecer, presentando una meseta durante toda la noche hasta la madrugada.

En la Tabla 1 se resumen los principales parámetros farmacocinéticos junto con su rango, obtenidos a partir del análisis de 22 artículos científicos (Harpsøe et al. 2015) en el que se administró MLT por vía intravenosa u oral en humanos:

Parámetro	Valor mínimo	Valor máximo
Dosis	0,3 mg	100 mg
C _{max}	72,1pg/ml (10 ml/h; 0,02 mg, IV)	101,16 pg/ml (100 mg, oral)
t _{max}	15 min (2 mg)	210 min (10 mg)
T _{1/2}	28 min (0,005 mg, IV)	126 min (4 mg, oral)
AUC	5400 pg/ml·min (0,005 mg, IV)	6.56×10 ¹⁰ pg/ml·min (1 mg, oral)
Cl	0,97 L/min (0.005 mg, IV)	132,50 L/min (6 mg, oral)
V _{dss}	35 L (0.005 mg, IV)	1602 L (4 mg, oral)
F	9 %	33 %

Tabla 1. Valores farmacocinéticos de MLT administrada exógenamente a humanos (Extraída de Harpsøe et al.).

A continuación se describen los procesos de ADME para la MLT en el organismo.

4.3.1. Absorción

La MLT es una molécula anfífila (Shida et al. 1994), ya que contiene grupos hidrófilos, pero tiene una estructura molecular altamente lipófila, lo que favorece su absorción a través de la piel.

Debido a que cumple la “regla del 5” de Lipinski, es una buena candidata para la penetración a través de la piel (Choy & Prausnitz 2011). Tiene un peso molecular inferior a 500 g/mol, en concreto de 232,3 g/mol. Su coeficiente de reparto (expresado como logP) es inferior a 5, concretamente de 1.18 a 28°C. Los números de enlaces dadores y aceptores de hidrógeno son inferiores a 5 y 10 respectivamente, teniendo 2 en ambos casos.

4.3.2. Distribución

Al ser la MLT una molécula anfífila, se distribuye fácilmente en la mayoría de tejidos y células.

En el plasma, la MLT es transportada en parte unida a albúmina (70%) y en parte en forma libre (30%) (Cardinali et al. 1972).

4.3.3. Metabolismo

La MLT se metaboliza principalmente en el hígado, donde se transforma en el metabolito mayoritario 6-hidroximelatonina. No obstante, la MLT puede metabolizarse en otros metabolitos en presencia de determinadas moléculas. Por ejemplo, en presencia de ROS se forman los metabolitos 2-hidroximelatonina, la 3-hidroximelatonina cíclica, el AFMK y el AMK. Algunos de los cuales a su vez, poseen actividad antioxidante, tal y como se detalla en la sección 4.3.3.4.

En la piel, implica vías indólicas y quinúricas y puede ser catalizada por reacciones enzimáticas o no enzimáticas. Las múltiples vías del metabolismo de la MLT se resumen en la Figura 16.

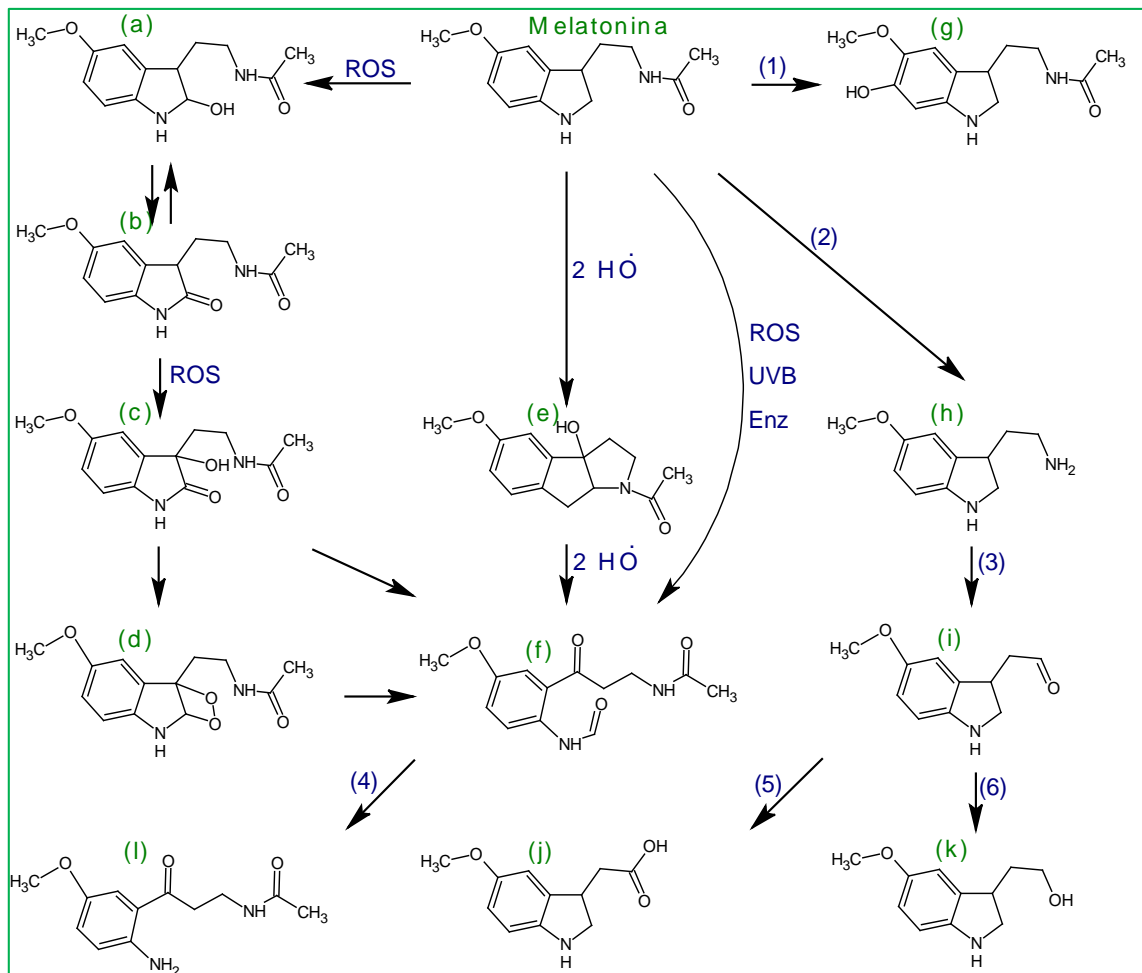


Figura 16. Proceso de metabolismo de la MLT en la piel. (a) 2-hidroximelatonina (b) MLT 2-indolinona (c) 3-hidroximelatonina 2-indolinona (d) MLT dioxetano (e) 3-hidroximelatonina cíclica (f) AFMK (g) 6-hidroximelatonina (h) 5-metoxitriptamina (i) 5-metoxiindoleacetaldehído (j) ácido acético 5-metoxiindólico (k) 5-metoxitriptofol (l) AMK. (1) CYP1A1, CYP1A2 o CYP1B1 (2) MLT deacetilasa (3) monoamina oxidasa (4) arilamina formamidasa, hemoperoxidasa y ROS/RNS (5) aldehído deshidrogenasa (6) alcohol deshidrogenasa.

4.3.3.1. Metabolitos de la MLT

Los metabolitos más habituales formados por reacción de la MLT con ROS y RNS se describen a continuación, junto con su actividad como antioxidante.

6-hidroxi melatonina

Tras su paso por la sangre, la mayor parte de la MLT se cataboliza en el hígado, donde se transforma en 6-hidroxi melatonina gracias a la acción de las enzimas del citocromo P450, como la CYP1A2, CYP1A1 o CYP1B1 (Ma et al. 2005) o por depuración de la MLT de 2 •OH.

En la piel, la MLT puede ser catabolizada a 6-hidroxi melatonina por un proceso enzimático que implica la CYP1B1 o por la interacción con el ONOO⁻ (Zhang et al. 1998) y •OH (Horstman et al. 2002).

La 6-hidroxi melatonina reduce la peroxidación lipídica y protege contra el daño del ADN (Qi et al. 2000; Lopez-Burillo et al. 2003) debido a que posee propiedades de depuración de radicales libres y antioxidantes (Matuszak et al. 2007; Maharaj et al. 2003; Liu et al. 2002).

2-hidroxi melatonina

Esta molécula se produce por la interacción de la MLT con HClO (Dellegar et al. 1999) y •OH (Horstman et al. 2002).

3-hidroxi melatonina cíclica

La MLT elimina 2 •OH para formar este metabolito (Tan et al. 1998), pero también puede ser producido por la interacción de la MLT con ONOO⁻ (Peyrot et al. 2003; Zhang et al. 1999). Esta molécula se convierte fácilmente en AFMK por la interacción de la MLT con ROS y RNS.

La 3-hidroxi melatonina cíclica es capaz de prevenir el daño oxidativo del ADN producido por las reacciones de Fenton (Lopez-Burillo et al. 2003).

AFMK

El metabolito AFMK se genera por la interacción de la MLT con múltiples moléculas, tales como H₂O₂ (Hirata et al. 1974), peroxidasa de rábano, mieloperoxidasa (Hardeland et al. 2003; Hardeland et al. 2006), citocromo C (Horstman et al. 2002), ¹O₂ (Hardeland et al. 1995; Almeida et al. 2003), radical carbonato y ONOO⁻ (Hardeland et al. 2003). Las células humanas generan AFMK cuando están expuestas a estrés oxidativo, como la radiación UVB (Fischer et al. 2006).

El AFMK es un potente antioxidante que puede donar 4 o más electrones para interaccionar con los radicales libres. Es tan potente como la MLT eliminando algunos radicales libres, tales como el •O₂⁻ (Maharaj et al. 2002). También reduce la peroxidación lipídica y la oxidación del ADN (Liu et al. 2002; Burkhardt 2001).

AMK

Este metabolito se genera por la interacción de AFMK con arilamina formamidasas, hemoperoxidasas o la interacción con ROS/RNS. El AMK es más eficiente como antioxidante que el AFMK (Ressmeyer et al. 2003).

Por lo tanto, no sólo la MLT, sino también sus metabolitos son altamente eficaces como reductores del daño oxidativo producido por los radicales libres, dotando a esta hormona de potentes propiedades antioxidantes (Tan et al. 2001; Mayo et al. 2005).

4.3.4. Excreción

Generalmente, la eliminación tiene lugar por excreción renal de los metabolitos; el 89% en forma de conjugados sulfatados y glucurónicos de la 6-hidroxi melatonina, el 2% en forma de MLT (principio activo inalterado) y el resto en forma de otros metabolitos (Agency 2014; Hardeland et al. 1993). No obstante, en presencia de estrés oxidativo y ROS, la formación de otros metabolitos es mayor y por tanto, los porcentajes pueden variar.

CAPÍTULO II.

OBJETIVOS Y PLAN DE TRABAJO

El **objetivo global planteado** en la presente tesis doctoral ha sido el estudio de la influencia de los ritmos circadianos de la piel en la farmacocinética de la MLT administrada exógenamente por vía transdérmica.

Por lo tanto, esta tesis se incluye en **diversas áreas de conocimiento**, la primera es la Tecnología Farmacéutica, necesaria para el desarrollo de una formulación adecuada para su uso dérmico y transdérmico y su caracterización. Por otro lado está la Biofarmacia y la Farmacocinética, necesarias para estudiar el comportamiento de la MLT tanto en condiciones *ex vivo* como *in vivo*. Y por último la Cronobiología, necesaria para estudiar los ritmos en el modelo animal seleccionado y relacionarlo con el estudio farmacocinético.

Bajo estas premisas y con el fin de dar respuesta al objetivo global planteado, **el plan de trabajo** de esta tesis doctoral ha constado de las siguientes fases:

Fase 1: Desarrollo de formulaciones de aplicación dérmica y transdérmica con MLT.

1. Desarrollar y validar una metodología analítica adecuada para cuantificar MLT en las muestras de los estudios de liberación y permeación *ex vivo*.
2. Diseñar, elaborar y caracterizar distintas formulaciones con MLT, aptas para uso dérmico y transdérmico.
3. Realizar el estudio de liberación, permeación dérmica y absorción transdérmica de las formulaciones. La formulación con mejores resultados ha sido la formulación escogida para las siguientes fases.
4. Diseñar, elaborar y caracterizar formulaciones derivadas de la óptima añadiendo filtros solares.
5. Realizar el estudio de liberación, permeación dérmica y absorción transdérmica de las formulaciones con filtros solares.
6. Predecir la actividad antioxidante de las formulaciones, mediante un método *in vitro*.

Fase 2: Selección del modelo animal y caracterización de los ritmos funcionales de la piel.

7. Realizar una revisión bibliográfica para seleccionar el modelo animal más adecuado para el estudio.
8. Estudiar el ritmo circadiano de actividad de la rata *Hairless*, en condiciones de LD y en condiciones de curso libre, para establecer el ritmo endógeno del animal.
9. Estudiar el ritmo circadiano de la funcionalidad de la piel en el modelo animal seleccionado. Paralelamente al punto anterior, realizar el estudio del ritmo de la temperatura cutánea, la pérdida de agua transepidérmica y la hidratación de la piel a lo largo del día.
10. Estudiar los efectos de las alteraciones de los ritmos circadianos de los animales, por exposición a luz constante, sobre la funcionalidad de la piel.

Fase 3: Estudio cronofarmacocinético in vivo de la formulación con MLT

11. Diseñar y ejecutar el estudio de cronofarmacocinética, en el cual se administra en la piel la formulación obtenida en el punto 3 a 2 horas del día diferentes en base a los resultados de punto 9.
12. Adicionalmente, administrar por vía IV una solución con MLT, a los mismos ZTs que en el punto 11 para estudiar los parámetros farmacocinéticos intrínsecos de esta sustancia. Y realizar una administración por vía oral, a uno de los ZTs, para comparar la biodisponibilidad entre la vía oral y la vía transdérmica.
13. Analizar las muestras mediante una técnica que permite la determinación de MLT y de su metabolito AFMK en plasma. Y estudiar si existen diferencias en las cinéticas plasmáticas en los 2 ZTs, en función del ritmo de la piel y del ritmo central de la rata.
14. Estudiar los efectos de la aplicación de la formulación escogida en el punto 6 cuando se aplica radiación UV *in vivo* a 2 ZTs distintos. Comprobación de la eficacia de la formulación para prevenir el eritema.
15. Realizar el estudio de la cantidad de MLT retenida en piel *in vivo*, aplicada en 2 ZTs distintos. Comprobar si existen diferencias en la cantidad de MLT, entre las muestras obtenidas a cada uno de los ZTs, usando el método analítico validado en el punto 1.

CAPÍTULO III. RESULTADOS

Artículo 1

**TRENDS IN MELATONIN DELIVERY: TRANSDERMAL AND
TRANSBUCCAL EVALUATION**
*(Tendencias en la liberación de melatonina: evaluación transdérmica y
transmucosa)*

**Ana Flo, Ana C. Calpena, Lyda Halbaut, Erika Araya,
Fran Fernández, Beatriz Clares**

Artículo sometido a publicación

Una parte de este estudio ha sido presentada en formato de póster en la siguiente jornada:

- *Estudio de liberación de un gel nanoestructurado de Melatonina.* Clares, B.; Calpena, A.C.; Fernández, F.; Mallandrich, M.; Araya, E.I.; Lauroba, J.; Flo, A. IV Jornada in2ub, Barcelona, España, Noviembre 2011.

Nota: Pese a que en este artículo se incluyen tanto formulaciones para aplicación a nivel de la piel, como para aplicación en la mucosa oral, esta tesis se centra únicamente en aquellas desarrolladas para ser aplicadas en la piel.

Resumen

Objetivo: El objetivo de este estudio fue investigar los efectos de diversos vehículos hidrófilos y lipófilos en la permeación y absorción de MLT través de la piel.

Métodos: A estos efectos, se usaron varios vehículos indicados para esta vía. Se realizó la caracterización de la formulación en términos de reología y se realizaron estudios de estabilidad física. Los estudios de liberación permitieron evaluar el mecanismo de liberación de MLT *ex vivo* y su permeación a través de la piel humana, así como la cantidad de MLT retenida en ésta.

Resultados: Los perfiles de liberación *in vitro* de MLT mostraron que la formulación formada por el sistema de emulsión M68 era la que mayor cantidad de MLT liberaba. Además, los estudios *ex vivo* de permeación a través de la piel humana revelaron un patrón de permeabilidad alto para C940 y M68, y una penetración pobre en la en el caso de la formulación de P407 y PLO. Se observaron diferencias estadísticamente significativas en las cantidades de MLT retenidas en piel entre M68 vs C940 ($p < 0,05$) y M68 vs PLO ($p < 0,05$).

Conclusión: Teniendo en cuenta los resultados obtenidos en este estudio, las formulaciones C940 o M68 se pueden proponer como vehículos para aplicación transdérmica de MLT para un potencial efecto sistémico. Pero, si el objetivo es la obtención de la acción de la MLT a nivel local en la piel, los vehículos propuestos son M68 o P407.

Melatonin delivery: Transdermal and transbuccal evaluation in different vehicles

Ana Flo ¹, Ana C. Calpena ¹, Lyda Halbaut ¹, Erika I. Araya¹, Francisco Fernández ¹,
Beatriz Clares ^{2,*}

^a *Department of Pharmacy and Pharmaceutical Technology, School of Pharmacy,
University of Barcelona, Barcelona, Spain*

^b *Department of Pharmacy and Pharmaceutical Technology, School of Pharmacy,
University of Granada, Granada, Spain*

* **Corresponding author at:** Departamento de Farmacia y Tecnología Farmacéutica,
Universidad de Granada, Campus Universitario de la Cartuja, s/n, Granada 18071,
España.

Tel: +34 958 243900; Fax: +34 958 248958; E-mail: beatrizclares@ugr.es

Abstract

Purpose Melatonin (MLT) could be candidate drug for treatment of several diseases because of its high antioxidant and anticarcinogenic activity and its important biological roles. The aim of this study was to investigate the effects of various hydrophilic and lipophilic vehicles on the permeation of MLT across buccal mucosa and skin.

Methods Formulations were characterized in terms of rheology, drug release and permeation through human skin as well as porcine buccal mucosa.

Results The lowest amount of MLT released was from oral adhesive paste Orabase[®] (OB) and the highest from the emulsion system Montanov[®] 68 (M68). Skin permeation revealed high pattern for Carbopol[®] 940 (C940) and M68, and poor for poloxamer 407 (P407) and Pluronic[®] lecithin organogel (PLO). Statistical differences of MLT remaining in skin between M68 vs C940 ($p < 0.05$) and M68 vs PLO ($p < 0.05$) were observed. Transmucosal results showed that sodium carboxymethylcellulose (NaCMC) was the best and OB the worst vehicle. P407 and PLO followed similar behaviour.

Conclusions C940 or M68 and NaCMC can be proposed as formulations for a potential systemic effect of MLT by skin and buccal mucosa routes, respectively. However, if the intended objective is to obtain local action in the skin and buccal mucosa, the proposed formulations are M68 or P407 and PLO.

Key words: Melatonin, skin, buccal mucosa, absorption, retention

Abbreviations

MLT	Melatonin
NaCMC	Carboxymethylcellulose
OB	Orabase [®]
P407	Poloxamer 407
PLO	Poloxamer lecithin organogel
C940	Carbopol [®] 940
M68	Montanov [®] 68
MCTs	Medium chain triglycerides
PHE	Perhydroesqualene
MC	Methylcellulose
NYL	Nylon
PS	Polysulfone
AIC	Akaike's Information Criterion
TEWL	Transepidermal water loss
TMWL	Transmucosal water loss
TPMT	Transmucosal permeation mean time
AUC	Area under the curve
E	Efficiency

1. Introduction

Melatonin (MLT), N-acetyl-5-methoxytryptamine, is a hormone synthesized at night-time in the pineal gland through a sequence of well known reactions from serotonin (1). MLT is also synthesized in other organs, in which exerts local effects (2). Melatonin acts on the suprachiasmatic nucleus to assist in the modulation of circadian rhythms, and it influences the function of virtually all cells in the body (3). Then it is involved in the regulation of the sleep-wake cycle, as well as, several biological functions, such as the modulation of mood, the control of seasonal reproduction in mammals (4), and the immune response modulation in humans (5). Recent studies have demonstrated the functions of melatonin to be more complex and not solely related to circadian cycles by association with cellular organelles and interaction with receptors (6). It has been shown the paracrine, autocrine and antioxidant properties of melatonin molecules (7) and as free radical scavenger (8). Free radical damage has been implicated in a wide variety of diseases which are suppressed with the use of MLT in experimental models as exposure for drugs, schistosomiasis, heavy metal toxicity, amyloid b protein exposure (as model of Alzheimer's disease) (8). It also protects against ischemia reperfusion injury (12) (9) and presents anti-tumor activities (10). Topical formulations comprising melatonin in combination with ultraviolet filters was also found to have a protectant action on the skin against irradiation (11). Other important roles of melatonin with a local effect, generally related with MLT receptor MT-1, in the oral conditions have been described, so MLT in herpes infection of the oral cavity has been compared with Acyclovir (12). MLT treatment produces an inhibitory action on oral squamous cell carcinoma (13). Other local effects of MLT including caries; periodontal disease; candidiasis; inflammatory processes; xerostomia; oral ulcers and oral cancer have been also reviewed(14).

Considering these relevant biological properties and its extremely low toxicity, MLT could be candidate as a drug for several diseases. MLT has usually been developed as orally administered formulation, but its pharmacokinetic parameters make this route less preferable because MLT has variable oral absorption. In elderly patients absorption can be reduced to 50%, and food can affect the absorption rate and plasma melatonin levels. Moreover it possess a very short plasma half-life ($t_{1/2}$ 45m), and an extensive first pass metabolism leading to low bioavailability (~15%) (15).

To overcome all these problems others routes of administration have been investigated, among these, transdermal and transbuccal route (16). Transdermal drug delivery offers several advantages over the conventional dosage forms including elimination of first pass metabolism, minimization of pain, and possible sustained release of drugs. However, the highly organized structure of the stratum corneum forms an effective barrier to the permeation of drugs. Likewise, oral transmucosal drug delivery with a local or systemic effect has been explored intensively, because oral cavity provides numerous remarkable advantages, high vascularization with venous blood reaching the heart directly via the internal jugular vein (17). Other advantages are low enzymatic activity, easy drug withdrawal, facility to include permeation enhancer, enzyme inhibitor or pH modifier in the formulations and versatility in designing as release systems for local or systemic actions (18). However the relatively small surface area of the oral mucosa and the potential loss of drug due to swallowing and salivary flow are the main limitations of this route (19).

On the other hand, controlled release formulations have been proposed in some studies (20) to tackle the disadvantages of the oral administration of MLT. Selection of a vehicle is very important as it can affect both drug release and absorption. Buccal gels like sodium carboxymethylcellulose (NaCMC) or pastes like Orabase[®] (OB) have been

utilized for its sustained and controlled drug release (19). But continuous research into the improvement of the transbuccal delivery of drug has resulted in the development of novel dosage forms like hydrogels (18), which are applied topically into the mucosal surface for either local or systemic effects, among these Pluronic[®] F127 also known as poloxamer 407 (P407) and Pluronic[®] lecithin organogel (PLO).

Taking these premises into account, the principal purpose in the present work was to investigate the effects of various hydrophilic and lipophilic vehicles on the penetration of MLT across buccal porcine mucosa and human skin. The vehicles used in the study were: NaCMC, OB, Carbopol[®] 940 (C940), micellar gel P407, PLO and Montanov[®] 68 (M68).

2. Materials and methods

2.1 Materials

Products used as components of the formulations were: the active substance MLT from Sigma (St. Louis, USA). P407, isopropyl palmitate, granulated soya-lecithin, NaCMC, glycerine, OB, alkylpolyglucoside non-ionic emulsifier cetearyl alcohol and cetearyl glucoside (M68), medium chain triglycerides (MCTs), perhydroesqualene (PHE), polyvinyl carboxy polymer (C940), and triethanolamine from Fagron (Terrassa, Spain).

Solvents and reagents used were: ethanol and methanol HPLC quality from Panreac (Barcelona, Spain). Double distilled water was used after filtration in a Milli-Q[®] Gradinet A10 system apparatus (Millipore Iberica S.A.U., Madrid, Spain) to a resistivity of 18.2 M Ω cm.

2.2. Developed formulations

Six formulations were elaborated to evaluate their ability to deliver MLT through the buccal mucosa or skin. NaCMC and OB vehicles were selected based on their suitability for transbuccal permeation, C940 and M68 for skin permeation. To prepare the NaCMC vehicle firstly a NaCMC gel was made by adding NaCMC (4% w/w) to glycerine (8%

w/w) and mixing. Then water was heated up to 50 °C, and incorporated by shaking until mixture reached room temperature. After storing (2–8 °C) for 24 h, MLT was incorporated into the gel at a concentration of 1% (w/w), obtaining a transparent, whitish in colour and odourless gel, where MLT was completely dissolved.

The OB vehicle was prepared by mixing the active with three drops of paraffin. After, small amounts of OB were gradually incorporated forming the gel of MLT at 1% (w/w).

O/W emulsion of MLT was prepared using M68 as surfactant agent (5%; w/w). MCTs (5%; w/w) and PHE (5%; w/w) were used as components of the oil phase, as aqueous phase double distilled water was utilized. For this purpose oil phase and aqueous phase were heated separately until reach a temperature of 70 ± 2 °C. Aqueous phase was incorporated on the oil phase and cooled with stirring according to the procedure described by Sierra et al. (11) until an emulsion was obtained. MLT was added in the cooling phase of the emulsion preparation at 35 ± 2 °C whilst mixing at 500 rpm (1 min) and the emulsion was homogenized at 300 rpm to room temperature.

C940 gel was prepared by adding C940 to water, then was put to rest at 4 °C for 24 h, with periodic shaking to ensure complete dissolution. After 24 h, water was added to bring the volume up to the final volume of 100 mL (1% w/v), and neutralized to eudermic pH with triethanolamine.

On the other hand, another two vehicles for transdermal and transmucosal drug delivery were tested: gel P407 and PLO. The P407 formulation was prepared by adding P407 (20%; w/v) to water letting the mixture stand under refrigeration at 4 °C for 24 h, with periodic shaking to ensure complete dissolution. After 24 h, water was added to bring the volume up to the final volume of 100 mL. MLT was then added to the aqueous phase (1% w/w). For PLO, the oil phase was prepared by mixing granulated soy lecithin (10%; w/v) and isopropyl palmitate (10%; w/v) at room temperature and letting the mixture stand

until dissolution was completed. The aqueous phase, gel P407 (at 4 °C), was incorporated into the oil phase by rapid shaking. MLT was then added to the aqueous phase (1% w/w). Moreover a MLT saturated solution was prepared in order to study the intrinsic MLT characteristics, comparing the excipient effect of the MLT permeation. The MLT saturated solution was elaborated by agitating on an environmental shaker at 25 ± 0.1 °C for 12 h. After equilibration, the suspension was filtered through a 0.45 μm nylon filter. The concentration of melatonin was 1.532 $\mu\text{g/mL}$.

2.3. pH measurements

pH values were measured by immersing the probe directly into the sample using a Crison 501 digital pH/mV-meter (Crison, Spain) with the electrode for viscous samples. Stability was evaluated as pH during the storage period to predict the compatibility of samples in contact with human skin. All measurements were performed at room temperature in triplicate.

2.4. Rheological characterization

Assays were run at increasing shear rates 25, 50 and 100 s^{-1} . The device consisted in a rotational rheometer HAAKE Rheostress 1 (Thermo Fisher Scientific, Karlsruhe, Germany) equipped with cone-plate geometry (diameter 35 mm and 2° angle). Different gaps between plates were tested and a separation of 0.5 mm was selected and provided with air bearing of fourth-generation and digital signal processor. All measurements were carried out in triplicate at 25 °C. All analyses were performed at least three times.

The models of Newton, Bingham, Ostwald-De-Waele, Herschel- Bulkley and Casson, were fitted to the rheological data obtained from each formulation. The rheometer was connected to a computer provided with the software HAAKE RheoWin1 Job Manager V. 3.3 to carry out the test and RheoWin1 Data Manager V. 3.3 (Thermo Electron Corporation, Karlsruhe, Germany) to carry out the analysis of the obtained data. Prism1,

V. 3.00 software (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA) was used for the fitting calculation.

2.5. Stability studies

Three stability methods were performed. The first accelerated test concerned stability at elevated temperatures, (15 days at 50 °C), and the second concerned stability under centrifugation, 15 min at 5000 rpm. In addition, samples were stored at room temperature for 6 and 12 months to examine real time stability. Flow properties and pH were measured after stability tests and data were compared with values obtained 24 h after emulsion preparation.

2.6. Melatonin quantification

MLT was quantified by means of the previously validated high-performance liquid chromatography (HPLC) method (11), using a Waters LC module one plus chromatograph with an UV-Vis 2487 detector (Waters, Milford, MA, USA Waters) set at 223 nm (λ_{max}), and a SunFire C18 3.5 μm column (150 mm \times 4.6 mm) (Waters, Milford, MA, USA Waters) at room temperature. The mobile phase consisted of methanol:water (50:50, v/v), pumped isocratically at a flow rate of 1 mL/min. The injection volume was 50 μL , and the MLT retention time was 4.9 min.

2.7. *In vitro* release study and kinetic evaluation

In vitro release studies were performed using vertical diffusion Franz cells (FDC-400) supplied by Vidra-Foc (Barcelona, Spain). It consists of two compartments with a membrane clamped between the donor and receiver chambers. The membranes were 47 mm in diameter and 0.45 μm in pore size. Three types of membranes were tested: methylcellulose (MC) (Teknokroma, Barcelona, Spain), nylon (NYL) (Waters Corporation, Milford, MA, USA) and polysulfone (PS) (Pall Corporation, Gelman Sciences, Ann Arbor, MI, USA). The best membrane was selected for this assay.

The receiver compartment had a volume of 12 mL and effective diffusional area of 2.54 cm², and was filled with ethanol/water (60:40) as receptor phase. This receptor medium allowed keeping perfect sink condition in the whole experiment. It was constantly stirred with a small magnetic bar and thermostated at 32 ± 1 °C throughout the experiments. On the donor phase 200 mg of each formulation were placed.

Samples of the receiver compartment were extracted after elapsed times of 0.167, 0.250, 0.500, 0.750, 1, 1.5, 2, 4 and 6 hours, replaced with an equal volume of fresh solution to ensure sink conditions. Concentrations of released drug values are reported as the mean ± SD of the six replicates.

The data obtained from *in vitro* release studies were fitted to various kinetic equations to find out the mechanism of melatonin release from emulsions. Five different kinetic models were used: zero order, first order, Higuchi, Weibull functions. In order to better characterize the drug release behaviour Korsmeyer-Peppas model was further applied.

$$\%R_t / \%R_\infty = k \times t \quad \text{Zero order} \quad (1)$$

$$\%R_t / \%R_\infty = 1 - e^{-K \times t} \quad \text{First-order} \quad (2)$$

$$\%R_t / \%R_\infty = k \times t^{1/2} \quad \text{Higuchi's equation} \quad (3)$$

$$\%R_t / \%R_\infty = 1 - e^{-(t/td)^\beta} \quad \text{Weibull's equation} \quad (4)$$

$$\%R_t / \%R_\infty = k \times t^n \quad \text{Korsmeyer-Peppas's equation} \quad (5)$$

where $\%R_t$ is the percentage drug released at time t , $\%R_\infty$ is the total percentage drug released, $\%R_t / \%R_\infty$ is the fraction of drug released at time t , k is the release rate constant, td is the time in which the 63.2% of the drug is released, β is the shape parameter, and n is the diffusion release exponent.

A nonlinear least-squares regression was performed using the WinNonLin[®] Professional edition software, version 3.3 (Pharsight Corporation, Sunnyvale, CA, USA), and the

model parameters calculated. Also the Akaike's Information Criterion (AIC) was determined for each model as it is an indicator of the model's suitability for a given dataset.

$$\text{AIC} = n \times \ln \text{SSQ} + 2p \quad (6)$$

where n is the number of pairs of experimental values, SSQ is the residuals sum of squares and p is the number of parameters in the fitting function.

The smaller the value of Akaike's Information Criterion is, the better the model adjusts the data. For the model selection the parameter accuracy was also taken into account expressed as % coefficient of variation (%CV) and the residual distribution plots.

2.8. *Ex vivo* permeation experiments

2.8.1. Human skin and porcine buccal mucosa samples

Human skin from abdominal plastic surgery of healthy patients was used as a permeation membrane. For the experiment, skin was cut using an Aesculap GA 630 dermatome, (Aesculap, Tuttlingen, Germany) into 400 μm thick pieces at room temperature. The experimental protocol was approved by the Bioethics Committee of the Barcelona SCIAS Hospital (Spain), and written informed consent forms were provided by volunteers.

On the other hand, 3-4-month-old male and female pigs ($n = 6$) were purchased from the Animal Facility at Bellvitge Campus, University of Barcelona. The porcine buccal mucosa from the cheek region was surgically obtained immediately after the pigs had been sacrificed (using an overdose of sodium thiopental anaesthesia). The fresh buccal tissues were transferred to the laboratory in containers filled with Hank's liquid (Biological Industries, Kibbutz Beit Haemek, Israel). The study was approved by the Ethics Committee of Animal Experimentation of the University of Barcelona. The majority of the underlying connective tissue was removed with a scalpel. Then 500 ± 50 μm thick sheets, corresponding to buccal epithelial thickness, which contributes to the

diffusional barrier (18), were dermatomed and trimmed with surgical scissors in adequate pieces.

Each tissue sample was measured in triplicate using a DermaLab[®] module (Cortex Technology, Hadsund, Denmark) to check the integrity by placing the metering device perpendicular to the surface of the tissue and reaching a stable transepidermal or transmucosal water loss (TEWL, TMWL) reading in 60 s approximately. TEWL/TMWL (expressed in grams per square meter and hour) is defined as the measurement of the quantity of water that passes from inside the body through the epidermal layer of the skin or the outer layer of the mucosa to the surrounding atmosphere via diffusion and evaporation processes. TEWL and TMWL values higher than 10 and 30 g/m²·h, respectively, were ruled out from the experiment.

All devices utilized were previously sterilized. The tissue handling was done by following basic safety standards for protection against possible exposure to viral pathogens. The material used was sterilized in the steribox[®] 101 (Galfa Ibérica S.L., Castelldefels, Spain) at 150 °C for 20 min while biological material residues were eliminated in special containers that are at low temperatures.

2.8.2. Permeation studies

Permeation study was performed on vertical amber glass Franz-type diffusion cells FDC 400 (Crown Glass Co. Inc. Somerville, NJ., U.S.A.). The excised skin or mucosa was mounted between donor and receptor compartment of Franz diffusion cell, avoiding bubbles formation, in case of skin with stratum corneum side facing the donor compartment and the dermis facing the receptor medium receiver compartment and the buccal mucosa with the epithelium faced the donor chamber and the connective tissue region facing the receiver chamber, which was filled with ethanol/water (60:40; v/v). This is a biocompatible medium that allows keeping sink conditions in all the experiment

reference and test formulation ($n = 6$, respectively). Samples of 200 and 100 mg (skin and mucosa, respectively) of each formulation were applied to the donor compartment and sealed by Parafilm[®] immediately to prevent water evaporation. Temperature was kept at 32 ± 0.5 °C and 37 ± 0.5 °C for skin and mucosa permeation, respectively, to mimic *in vivo* conditions by a circulating-water jacket and stirred with a magnetic rotor at a speed of 700 rpm. Aliquots of 300 μ L were withdrawn at regular time intervals (up to 25 h for skin permeation and 6 h for mucosa permeation study) and replaced with the same volume of ethanol/water (60:40; v/v) after each collection with great care to avoid trapping air beneath the dermis. Sink conditions were met in all cases. Six parallel determinations were performed using skin or mucosa from the same donor to evidence the differences among the formulations that are not attributed to the variability of the biological samples. The samples were taken into 1.5 mL amber vials and kept at -20 °C until analyzed by HPLC.

2.8.3. Calculation of the permeation parameters

The cumulative amount of melatonin permeated through excised tissues was plotted as function of time. The slope and intercept of the linear portion of the plot was derived by regression using the Prism[®], V. 3.00 software (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA). MLT fluxes (J , μ g/cm²/h) through the biologic membranes from the assayed formulations were calculated from the slope of linear portion of the cumulative amounts permeated through the membrane per unit surface area versus time plot, and the extrapolation of this line will intercept with the X-axis at a time equal to lag time (T_l , h).

The permeability coefficients (Kp , cm/h) were obtained by dividing the flux (J) by the initial drug concentration (C_0) in the donor compartment, and it assumed that under sink

conditions the drug concentration in the receiver compartment is negligible compared to that in the donor compartment.

$$K_p = \frac{J}{C_0} \quad (7)$$

Once parameters J_s , T_l and K_p are calculated, partition parameter P_1 and the diffusion parameter P_2 can be obtained from the following equations:

$$K_p = P_1 \times P_2 \quad (8)$$

$$T_l = 1/6 \times P_2 \quad (9)$$

The predicted steady-state plasma concentration of drug, which would penetrate skin or mucosa barrier after topical application, was obtained using the equation (10), considering a membrane surface of 2.54 cm² and a MLT plasma clearance of 1 mL/s (21):

$$C_{ss} = \frac{J \times A}{Cl_p} \quad (10)$$

where C_{ss} is the plasma steady-state concentration, J the flux determined in this study, A the hypothetical area of application and Cl_p the plasmatic clearance.

Finally, in order to obtain as much information as possible, experimental data obtained from permeation studies as a function of time were fitted to the kinetics models represented in equations (1)–(5), and equation (6) to discriminate among models, and modelistic permeation parameters were calculated if applicable. Besides, some amodelistic permeation parameters were also estimated, as transmucosal permeation mean time (TPMT) that is the mean residence time of the drug in the mucosa along the process, the area under the curve (AUC) that represents the amount of unchanged MLT that access to systemic circulation, and efficiency (E), which represents the amount of drug in systemic circulation versus the maximum amount of MLT permeated at a certain time.

2.8.4. Skin and mucosa retention

At the end of the permeation study, the amounts of MLT remaining on the skin and mucosa were quantified in order to know if there were differences between formulations. The membrane was removed from the Franz cells, cleaned with gauze soaked in a 0.05% solution of dodecyl sulphate and washed in distilled water. The permeation areas of the tissue were cut and weighed. Retained MLT was extracted with ethanol/water (70:30; v/v) mixture during 20 min under cold sonication in an ultrasound bath. The resulting solutions were centrifuged (1500 rpm) for 10 min and MLT levels (expressed as $\mu\text{g}/\text{g}\cdot\text{cm}^2$ of skin/mucosa) were measured by HPLC yielding the amount of drug retained (22):

$$Q_{\text{ret}} = \left(\frac{E_{x_x}}{P_x} \right) / 2.54 \times \frac{100}{R} \quad (11)$$

where Q_{ret} is the amount of retained MLT after the permeation assay through 2.54 cm^2 area. E_{x_x} is the amount of MLT extracted. P_x is the weight of each tissue sample. And R is the value of recuperated percentage.

2.10. Statistical analysis

Data were statistically analyzed by one-way ANOVA, followed by Bonferroni's multiple comparison t-test. The level of significance was set at $p < 0.05$ using Prism[®], V. 3.00 software (GraphPad Software, Inc., San Diego, CA).

3. Results

3.1. pH and rheological studies

pH was slightly acidic in all the freshly made up formulations (ranging from 6.25 ± 0.04 to 6.78 ± 0.1). No significant changes over time were observed in either formulation.

The flow and viscosity curves of the formulations (shear stress versus shear rate in red, and viscosity versus shear rate in blue) are shown in Fig. 1. Mathematical models for each formulation and values of each parameter are reported in Table I.

3.2. Stability of formulations

After 15 days of storage at 50 °C macroscopic observations did not reveal any sign of instability. On the other hand, all samples passed the centrifugation stability test.

The 6 and 12 months stability study at room temperature showed that after visual observation no phase physicochemical destabilizing processes took place. Rheological parameters τ_0 , K and n were determined with the aim of checking the effect of passing time on the stability of these formulations and no significant changes were observed ($p < 0.05$). pH values either exhibited statistically significant changes after storage period.

3.3. Quantification

The validation of the HPLC method proposed to quantify MLT was previously assessed for linearity, accuracy and precision, according international guidelines.

Working standards solutions from 50 to 0.39 $\mu\text{g/mL}$, were prepared daily by suitable dilutions of the MLT stock solution (1 mg/mL) in the mobile phase. Six calibrations curves were prepared and validated inter-day. Linear relationship between peak area and concentrations of calibration curves were statistically confirmed by applying an analysis of variance (one-way ANOVA) of the different values, and no statistical significant differences were found between them ($p > 0.05$), correlation coefficients ranging from 0.9997 to 0.9999. Precision of the analytical method, expressed in percentage of variation coefficient ranged between 9.23% and 0.20%. Finally accuracy expressed as relative error ranged from 6.29% to -2.02%. The lower limit of quantification was set at 0.34 $\mu\text{g/mL}$.

The selectivity of the permeation assay was confirmed by the individual analysis of blank samples from skin or mucosa, and from the receptor side of the diffusion cells assuring that no interferences took place.

3.4. *In vitro* release study

In order to evaluate the drug release mechanism from formulations, we selected the most suitable membrane as that which offered the least resistance to the diffusion of the active MLT, in order to minimize the influence of membrane type in the test. For this study, a 5 mg/mL solution of the active substance was used as the donor phase. Fig. 2 shows the amounts of drug accumulated through each type of membrane (methylcellulose, nylon and polysulfone). As shown in Fig. 2, all membranes allowed the passage of MLT, however after 1 h the nylon and methylcellulose membranes had reached 18% and 27% respectively. In contrast, transfer was higher through the polysulfone membrane. Approximately 40% of the dose had crossed the membrane after 1 hour. Therefore, polysulfone was the selected as membrane for the release studies.

Once elaborated, the six formulations were submitted to an *in vitro* diffusion assay in order to evaluate if there were any differences in the release pattern. Fig. 3 shows MLT release profiles from vehicles and plain solution. As depicted in Table II, statistically significant differences were observed among formulations.

3.5. *Ex vivo* permeation experiments

The assessment of the skin or mucosa irritant potential of formulations could be provided by measuring an additional skin parameter as barrier function TEWL. The determination of the TEWL and TMWL before and after the studies, confirmed that no damage to the membranes was caused during experiments.

The transdermal permeated quantities of MLT through human skin from dermal formulations are shown in Fig. 4. It can be observed two different permeation profiles, C940 and M68 displayed high permeation rates with cumulative amounts about 180 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$, while P407 and PLO showed low permeation rates roughly 13 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ after 31 h.

T_l , Kp , J , P_1 and P_2 of MLT were calculated from the cumulative amounts of drug permeated through the skin plotted versus time in steady state conditions (Table III). Due to the data had a normal distribution, a Bonferroni parametric analysis of the experimental data was performed in this study. No statistically differences were found between C940 and M68, which exhibited the maximum values of J and Kp , and the minimum values of T_l . According to the literature, plasmatic clearance of MLT, Clp , is 1 mL/s (21), assuming a maximum area of a hypothetical area application of 2.5 cm² and using the J value previously calculated for each formulation, the plasmatic concentration under steady-state conditions (C_{ss}) was also calculated (Table III). As expected, the highest median values of theoretical plasmatic MLT were 2.10 and 1.59 ng/mL from the C940 and M68 vehicles respectively.

The median MLT amounts retained in the skin for C940, M68, P407 and PLO were: 26.87 (4.99 – 51.52), 100.44 (47.33–188.99), 42.37 (3.09 – 104.45) and 23.24 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{cm}^{-2}$ (1.45 – 147.10) respectively. Statistical differences in the skin remaining MLT between M68 vs C940 ($p < 0.05$) and M68 vs PLO ($p < 0.05$) formulations were observed.

On the other hand, transmucosal permeated quantities of MLT through porcine buccal mucosa from formulations is showed in Fig. 5.

Besides, some additional amodelistic parameters were also calculated and compared from the *ex vivo* permeation data (Table IV).

The observed values of MLT retained were in ascending order 6.64 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{cm}^{-2}$ (5.76–7.46) for OB, 8.47 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{cm}^{-2}$ (4.73–15.20) for P407, 14.30 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{cm}^{-2}$ (11.78–16.85) for NaCMC, and finally 16.69 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{cm}^{-2}$ (0.41–32.44) for PLO.

4. Discussion

Aqueous polymeric dispersions are very useful as platforms in drug delivery since they can resist the physiological stress caused by skin flexion, blinking, and mucociliar movement; adopting the shape of the application area and controlling the drug release (23). C940 is one such commonly used polymer of acrylic acid which possesses excellent water sorption property. It swells in water up to 1000 times its original volume and 10 times its original diameter to form a gel when exposed to a pH environment above 6.0.

M68 vehicle is an O/W emulsion in which M68 (5%; w/w) is the surfactant agent, MCTs (5%; w/w) and PHE (5%; w/w) were components of the oil phase, and water (quantity enough to 100%) as the aqueous phase.

NaCMC is a synthetic polymer typically used in transbuccal route. It has been shown to possess good hydrogel-forming and mucoadhesion properties from 120 to 180 min (24). Additionally, OB is a paste containing sodium carboxymethylcellulose 16.58%, pectin 16.58 % and gelatin 16.58% in plastibase (liquid vaseline-polyethylene). The bioadhesive property of this excipient lets its application on the oral mucosa, as it is practically insoluble in saliva; it remains adhered to the oral mucosa surface from 2 to 5 h forming an insulating film (25).

In our study, P407 and PLO have been utilized for both. Poloxamers are polyoxyethylene-polyoxypropylene-polyoxyethylene blocks polymers with amphiphilic applications; they are thermosensitive polymers forming mucoadhesive gels at body temperature. For transbuccal permeation, the dosage form must have good adhesive properties and show an efficient controlled drug delivery. PLO is a thermodynamically stable, viscoelastic, and biocompatible microemulsion-based gel (lecithin dissolved in isopropyl palmitate as oil phase and P407 water solution as aqueous phase). The objective of using these formulations was to improve the adhesion and the time contact of MLT in

the buccal mucosa compared with a MLT plain solution and to modulate MLT permeation.

The acidity of the skin ranges from pH 4–6, depending on the skin area and the age of the individual, due to the buffer system in the skin that is able to absorb small quantities of acid or alkali material applied to reduce irritation. Equally the mean buccal mucosa pH has been reported to be 6.78 ± 0.04 (26). Thus, those findings make these formulations suitable for topical application.

In the drug delivery systems, the modification of the rheological properties appeared to influence the controlled release of loaded drugs from the topical formulations. Knowledge of rheological and mechanical properties has an outstanding importance, and may lead to possible use of the resulting rheological parameters to optimize drug delivery from dermatological formulations (27). All samples revealed non-Newtonian behaviour, when the shear rate increases, the viscosity values decrease (Fig.1). Under the influence of shear, the molecules tend to become disentangled and align themselves in the direction of flow offering less resistance. The hysteresis area (thixotropy) can be also observed, it is a pseudoplastic natural characteristic. Pseudoplastic materials can break down for easy spreading, and the applied film can gain viscosity instantaneously to resist running (11). This rheological behaviour could be described as typical for a non-Newtonian, and was observed in all rheograms obtained. The variations of rheological parameters differ and depend on the destabilization process involved (flocculation, creaming, coalescence, Oswald ripening).

In order to identify the model that provided the best overall match of the experimentally observed rheological data were fitted to mathematical models and based on the higher correlation coefficient of the linear regression (r^2) the appropriate model that statistically described the rheological behaviour was selected.

Two models were that best fitted the experimental data. On the one hand, M68, C940 and P407 conformed to the Cross equation with high degree of accuracy in both stretches ascendant and descendent, Cross is a four parameter model that covers the entire shear rate range. On the other hand, Herschel-Bulkley was the best for NaCMC and PLO. Herschel-Bulkley is a three-parameter empirical model developed to describe the behaviour of complex systems (28). Finally, OB fitted well these two models, Herschel-Bulkley for the ascendent stretch and Cross for the descendent (Table I).

The instability could become manifest through a variety of physicochemical destabilizing processes, such as creaming (or sedimentation), flocculation, coalescence or phase inversion. No instability processes were observed in assayed formulations. It was concluded that all formulations were stables.

Release studies revealed the lowest amount of MLT released was from OB with a percentage of $08.33 \pm 01.61\%$. At each time, there were found significant statistically differences (one way ANOVA, $p < 0.05$). OB is an oral adhesive paste, in which, the drug could be strongly entrapped within the paste and subsequently slowly released. Contrary, the $78.97 \pm 15.58\%$ of drug was diffused through the membrane to the receptor chamber within 6 h from M68 formulation. Moreover, C940 showed also high release pattern but slightly lower. A higher release rate was observed in the initial 2 h. From here onward, the drug release rate was relatively constant. M68 formulation is an emulsion system, supporting the hypothesis that larger interfacial areas present in emulsions with smaller drops can promote rapid drug release of poorly soluble drugs (29).

It has been reported the advantages of using empirical equations, they can be fitted very simply to experimental data (30). However, as main disadvantage it has been proposed that the constants in the equations lack physical meaning and are therefore dependent upon how the data are measured. As shown in Fig. 3 after fitting several release models

to the observed data, it can be observed that depending on the different nature of the excipients utilized in the formulations MLT release profiles followed different models. P407 and NaCMC followed the Weibull's equation, it has been typically considered as an empirical equation, in which, the value of the exponent β has been proposed as indicator of the mechanism of diffusion release. P407 β value of 0.84 are reported to correspond to diffusion in normal Euclidian substrate with contribution of another release mechanism (the power law can describe the entire set of data of a combined release mechanism). NaCMC β value of 0.71 is also indicative of diffusion in normal Euclidian space (31). In the case of MLT plain solution, PLO, M68 and C940 vehicles, first order was the best model that fitted our data; MLT was delivered at a rate proportional to the concentration gradient driving the transfer of drug movement, based on the first Fick's law, where the released amounts are directly proportional to the amounts remaining into the dosage form. Statistical differences were found for parameter k using a Bonferroni comparison test ($p < 0.05$) between PLO and C940, and statistical differences were found for parameter Q_{max} ($p < 0.05$) between PLO and M68.

Finally, the last formulation using OB as excipient, MLT release followed the Korsmeyer-Peppas's equation, the diffusion release exponent n (equation 5) could be used to characterize the release mechanism, $n \leq 0.43$ (Fickian diffusion), $0.43 < n < 0.89$ (anomalous transport), and $n \geq 0.89$ (case II transport; i.e. zero-order release). In this case 0.37 also indicates Fickian diffusion. In any case, it is also interesting to consider that *in vitro* release profiles (sink conditions) not always represent the *in vivo* microenvironment retarding drug diffusion.

Permeation studies were accomplished in Franz cells using skin supplied following cosmetic surgery. It is a well-established technique and the flux across skin often provides a good estimate of what is likely to happen *in vivo* (32). On the basis of the obtained

results it can be hypothesized that C940 and M68 formulations are the most suitable for a potential systemic effect of MLT. But, if the objective is to obtain an antioxidant local action in the skin, M68 and P407 are the most suitable because enough quantity of MLT remains in the skin, in accordance with previous studies (11).

Porcine buccal mucosa has very similar permeability characteristics to human mucosa in terms of lipid content and composition, membrane morphology and permeability barrier function. It has been estimated the permeability of oral mucosa, depending on the site, to be between 4 and 4000 times higher than skin (33). As shows Fig. 5, vehicles play an important role in the drug permeation through buccal mucosa since residence time is an important factor to take into consideration for *in vivo* conditions. NaCMC is an anionic polymer and the octanol-water partition coefficient of MLT ($\log P$) of 1.2 makes it less insoluble in this vehicle when compared with OB. In this case, NaCMC exhibited the best permeation profile. Contrary, OB was the worst vehicle for MLT delivery. P407 and PLO followed similar rates up to 5 h of the experiment. As MLT concentration in donor compartment decreased significantly with time through buccal mucosa, a kinetic modification had to be included, the finite-dose model (34). On the basis of a new fitting (equations 1-5, WinNonLin[®] Professional edition software, version 3.3) of the observed values the pharmacokinetics parameters were calculated. All formulations showed the smallest AIC value for first order kinetic except PLO that followed a zero order kinetic. Fig. 5 also shows median values and range of maximum quantity permeated (Q_{max}), first order permeation constant (K_d) and lag time (T_i) of P407, NaCMC and OB. MLT plain solution, P407, NaCMC and OB formulations followed first order penetration profile, thus the penetration rate through the mucosa is proportionally related to the amount of MLT in the formulation, for this behaviour, estimations about if therapeutic concentrations would be reached at a determinate time could not be carried out. However,

estimations of PLO, following a zero order model (represented in Fig. 5) could be performed. In this way, and taking in account the application area of 0.25 cm² and the concentration of the steady state must be 0.5 ng/mL (35) to reach a therapeutic amount of the active (depending on the disease to treat), all replicates would reach therapeutic levels, being the median value 2.89 ng/mL (0.57–5.22). Due to the steady state was reached in 18 min (T_i), calculated by means the values of transmucosal flux (*J*) 106.17 μg/h (20.98–191.60), it can be claimed that effective systemic levels of MLT would be reached very fast. A modelistic parameters are also very useful to compare different profiles types because the evaluation of dissolution characteristics of the different formulations is not conditioned by the goodness of the fitting to a theoretical model of our data. According to these results NaCMC was also the best vehicle for the drug permeation through the buccal mucosa. In the case of the latter possesses excellent bucoadhesive characteristics due to the formation of strong hydrogen bonding interactions with mucin. Taking into account retained amounts of MLT, PLO could be proposed as vehicle for an intended local effect in the buccal mucosa, and NaCMC for a systemic effect through the buccal mucosa. It is also necessary to notice that the term “buccal”, even if sometimes wrongly used to indicate the mucosa of the total oral cavity, refers to the lining of the cheek and the upper and lower lips, which represent one-third of the total oral mucosa surface (36). It must be taken into account the potential absorption by sublingual route, through which, it would be expected to increase systemic levels of MLT. The efficiency, despite being calculated cannot be used as a discriminatory manner. A minimum release of 90% is required to explain the process and this value was not reached in the 6 h of the study. The amount of MLT retained in the porcine buccal mucosa was determined at the end of the *ex vivo* permeation experiment since different studies have shown a reservoir

function for buccal mucosa (22, 37). This parameter represents the quantity of MLT retained in the buccal mucosa related to the applied dose at the end of the experiment.

5. Conclusions

MLT exerts a broad spectrum of effects on physiological functions. These effects could be used as therapeutically tool for both local and systemic levels. Results obtained in this work are important information strategy to elaborate medical formulations based on the intended effect of MLT through skin and buccal mucosa routes.

Acknowledgements

Judith Gómez is acknowledged for her technical help in this work.

References

1. Reiter RJ, Pineal melatonin: cell biology of its synthesis and of its physiological Interactions *Endocr Rev.* 1991;12:151–180
2. Reiter RJ, Tan DX, Mayo JC, Sainz RM, Leon J, Czarnocki Z. Melatonin and its metabolites: new findings regarding their production and their radical scavenging actions. *Acta Biochim Pol.* 2007;54:1–9.
3. Jarzynka MJ, Passey DK, Johnson DA, Konduru NV, Fitz NF, Radio NM, Rasenick M, Benloucif S, Melan MA, Witt-Enderby PA. Microtubules modulate melatonin receptors involved in phaseshifting circadian activity rhythms in vitro and in vivo evidence. *J Pineal Res.* 2009;46:161–171.
4. Cajochen C, Krauchi K, Wirz-Justice A. Role of melatonin in the regulation of human circadian rhythms and sleep. *J Neuroendocrinol.* 2003;15:432–437.
5. Guerrero JM, Reiter RJ. Melatonin-immune system relationships. *Curr Top Med Chem.* 2002;2:167–179.
6. Reiter RJ, Tan DX, Manchester LC, Pilar Terron M, Flores LJ, Koppisepi S. Medical implications of melatonin: receptor-mediated and receptor independent actions. *Adv Med Sci.* 2007;52:11–28.

7. Tan DX, Manchester LC, Hardeland R, Lopez-Burillo S, Mayo JC, Sainz RM, Reiter RJ. Melatonin: a hormone, a tissue factor, an autocoid, a paracoid, and an antioxidant vitamin. *J Pineal Res.* 2003;34:75–78.
8. Zhang HM, Zhang Y. Melatonin: a well-documented antioxidant with conditional prooxidant actions. *J Pineal Res.* 2014;57:131–146.
9. Lee YM, Chen HR, Hsiao G, Sheu JR, Wang JJ, Yen MH. Protective effects of melatonin on myocardial ischemia/reperfusion injury in vivo. *J Pineal Res.* 2002;33:72–80.
10. Maestroni GJ. The role of melatonin in immuno enhancement: potential application in cancer. *Int J Exp Pathol.* 2006;87:81–87.
11. Sierra AF, Ramírez ML, Campmany AC, Martínez AR, Naveros BC. In vivo and in vitro evaluation of the use of a newly developed melatonin loaded emulsion combined with UV filters as a protective agent against skin irradiation. *J Dermatol Sci.* 2013;69:202–214.
12. Nunes OS, Pereira RS. Regression of herpes viral infection symptoms using melatonin and SB-73: comparison with Acyclovir. *J Pineal Res.* 2008;44:373–378.
13. Nakamura E, Kozaki K, Tsuda H, Suzuki E, Pimkhaokham A, Yamamoto G, Irie T, Tachikawa T, Amagasa T, Inazawa J, Imoto I. Frequent silencing of a putative tumor suppressor gene melatonin receptor 1 A (MTNR1A) in oral squamous-cell carcinoma. *Cancer Sci.* 2008;99:1390–1400.
14. Gómez-Moreno G, Guardia J, Ferrera MJ, Cutando A, Reiter RJ. Melatonin in diseases of the oral cavity. *Oral Dis.* 2010;16:242–247.
15. Harpsøe NG, Andersen LP, Gögenur I. Clinical pharmacokinetics of melatonin: a systematic review. *Eur J Clin Pharmacol.* 2015;71:901–909.
16. Dubey V, Mishra D, Asthana A, Jain NK. Transdermal delivery of a pineal hormone: Melatonin via elastic liposomes. *Biomaterials* 2006;27:3491–3496.
17. Martin L, Wilson CG, Koosha F, Uchegbu IF. Sustained buccal delivery of the hydrophobic drug denbufylline using physically cross-linked palmitoyl glycol chitosan hydrogels. *Eur J Pharm Biopharm.* 2003;55:35–45.
18. Sudhakar Y, Kuotsu K, Bandyopadhyay AK. Buccal bioadhesive drug delivery: a promising option for orally less efficient drugs. *J Control Release* 2006;114:15–40.
19. Patel VF, Liu F, Brown MB. Advances in oral transmucosal drug delivery. *J Control Release* 2011;153:106–116.

20. Mallo C, Zaïdan R, Galy G, Vermeulen E, Brun J, Chazot G, Claustrat B. Pharmacokinetics of melatonin in man after intravenous infusion and bolus injection. *Eur J Clin Pharmacol.* 1990;38:297–301.
21. Cavallo A, Ritschel WA. Pharmacokinetics of melatonin in human sexual maturation, *J Clinical Endocrinol Metab.* 1996;5:1882–1886.
22. Fernández Campos F, Calpena Campmany AC, Rodríguez Delgado G, López Serrano O, Clares Naveros B. Development and characterization of a novel nystatin-loaded nanoemulsion for the buccal treatment of candidosis: ultrastructural effects and release studies. *J Pharm Sci.* 2012;101:3739–3752.
23. Yonese M. Sustained drug delivery by gels. In: Osada Y, Kajiwara K, editors. *Gels Handbook.* San Diego: Academic Press; 2001. p. 230–240.
24. Needleman I, Smales F. In vitro assessment of bioadhesion for periodontal and buccal drug delivery. *Biomaterials* 1995;16:617–624.
25. Sweetman SC. *Martindale, the extra pharmacopoeia.* London: The pharmaceutical press. 1977.
26. Aframian DJ, Davidowitz T, Benoliel R. The distribution of oral mucosal pH values in healthy saliva secretors. *Oral Dis.* 2006;12:420–423.
27. Shahin M, Hady SA, Hammad M, Mortada N. Novel jojoba oil-based emulsion gel formulations for clotrimazole delivery. *AAPS PharmSciTech.* 2011;12:239–247.
28. Bonn D, Denn MM. Yield stress fluids slowly yield to analysis. *Science* 2009;324:1401–1402.
29. Nielsen FS, Petersen KS, A Mullertz. Bioavailability of probucol from lipid and surfactant based formulations in minipigs: influence of droplet size and dietary state. *Eur J Pharm Sci.* 2008;69:553–562.
30. Siepmann J, Peppas NA. Modelling of drug release from delivery systems based on hydroxypropyl methylcellulose (HPMC). *Adv Drug Deliv Rev.* 2001;48:139–157.
31. Papadopoulou V, Kosmidis K, Vlachou M, Macheras P. On the use of the Weibull function for the discernment of drug release mechanisms. *Int J Pharm.* 2006;309:44–50.
32. Franz TJ. Percutaneous absorption on the relevance of in vitro data. *J Invest Dermatol.* 1975;64:190–195.
33. Galey WR, Lonsdale HK, Nacht S. The in vitro permeability of skin and buccal mucosa to selected drugs and tritiated water. *J Invest Dermatol.* 1976;67:713–717.
34. Hashida M, Okamoto H, Sezaki H. Analysis of drug penetration through skin

- considering donor concentration decrease. *J Pharmacobiodyn.* 1988;11:636–644.
35. Lee BJ, Parrott KA, Ayres JW, Sack RL. Preliminary evaluation of transdermal delivery of melatonin in human subjects. *Res Commun Mol Pathol.* 1994;85:337–346.
36. Rossi S, Sandri G, Carla M, Caramella CM. Buccal drug delivery: a challenge already won?. *Drug Dis Today Technol.* 2005;2:59–65.
37. Martín MJ, Calpena AC, Fernández F, Mallandrich M, Gálvez P, Clares B. Development of alginate microspheres as nystatin carriers for oral mucosa drug delivery. *Carbohydr Polym,* 2015;117:140–149.

Table I Rheological parameters of the melatonin formulations obtained by fitting the experimental data to the rheological models: Where is the τ is the shear stress (Pa), η is the viscosity (Pa·s), τ_0 is the shear rate (1/s), τ_0 is the yield shear stress (Pa), η_p is the consistency index (Pa·sn), k is the consistency (s) and n is the flow index, the different values of n indicate the fluid behavior. For a Newtonian fluid, $n = 1$. If $n < 1$, the fluid is called pseudoplastic; if $n > 1$, the fluid is dilatant

Formulation	Stretch	Model	Parameters									
			r^2	η	τ_0	η_p	n	K	K_1	η_0	η_∞	Y_0
Montanov	Ascendent	Cross	0.9966	–	–	–	0.66	–	–	477.20	–0.23	0.01
	Descendent	Cross	0.9999	–	–	–	0.84	–	–	4.95	0.26	1.98
Carbopol	Ascendent	Cross	0.9679	–	–	–	1.13	–	–	815.30	0.49	0.20
	Descendent	Cross	0.9996	–	–	–	0.91	–	–	860.10	0.25	0.55
NaCMC	Ascendent	Herschel-Bulkley	1.0000	–	–187.70	–	0.17	–	215.60	–	–	–
	Descendent	Herschel-Bulkley	0.9999	–	–73.19	–	0.28	–	99.74	–	–	–
Orabase	Ascendent	Herschel-Bulkley	0.9986	–	49.38	–	0.59	–	12.07	–	–	–
	Descendent	Cross	1.0000	–	–	–	0.89	–	–	1540	1.85	0.01
Poloxamer 407	Ascendent	Cross	0.9995	–	–	–	5.26	–	–	0.10	–14.90	400.90
	Descendent	Cross	0.9970	–	–	–	0.79	–	–	182.30	0.01	0.01
PLO	Ascendent	Herschel-Bulkley	0.9963	–	10.20	–	0.40	–	66.49	–	–	–
	Descendent	Herschel-Bulkley	0.9999	–	53.02	–	0.56	–	25.67	–	–	–

Table II Cumulative melatonin released (%) at 1, 2, 3, 4, 5 and 6h. Sodium carboxymethylcellulose (NaCMC); Orabase® (OB); Poloxamer 407 (P407); Carbopol® 940 (C940); Poloxamer 407 lecithin organogel (PLO) Montanov® 68 (M68)

Formulation	Q ₁	Q ₂	Q ₃	Q ₄	Q ₅	Q ₆
P407	34.61±4.90	40.19±03.65	43.64±04.06	46.85±05.78	47.99±06.05	48.14±06.85
PLO	29.71±3.26 ^{b,c}	39.60±04.47 ^{b,c}	47.82±06.77 ^{b,c}	50.59±08.99 ^c	52.37±08.61 ^{b,c}	55.08±10.87 ^{b,c}
OB	04.25±0.21 ^{a,b,c,d}	05.33±00.41 ^{a,b,c,d}	06.52±00.41 ^{a,b,c,d}	07.01±02.15 ^{a,b,c,d}	07.72±01.54 ^{a,b,c,d}	08.33±01.61 ^{a,b,c,d}
C940	46.61±6.29 ^a	63.16±05.43 ^a	65.51±05.96 ^a	66.53±07.54 ^a	66.92±08.23	67.04±09.17
M68	53.79±8.10 ^a	73.94±13.57 ^a	74.26±13.25 ^a	77.81±14.42 ^a	78.25±14.54 ^a	78.97±15.58 ^a
NaCMC	22.01±1.78 ^{a,b,c,e}	30.10±04.71 ^{b,c,e}	37.89±04.41 ^{b,c,e}	35.05±03.74 ^{b,c,e}	36.82±05.84 ^{b,c,e}	40.88±06.85 ^{b,c,e}

Statistically significant differences $p < 0.05$ regarding ^a Poloxamer 407, ^b Carbopol® 940, ^c Montanov® 68, ^d Poloxamer 407 lecithin organogel and ^e Orabase®.

Table III Lag time (T_l), permeability coefficient (K_p), flux (J), partition coefficient (P_1) and diffusion constant (P_2), predicted plasmatic concentrations under steady-state (C_{ss}) for the transdermal assayed formulations. Results are shown as the median and range (min–max). Poloxamer 407 (P407); Carbopol[®] 940 (C940); Poloxamer 407 lecithin organogel (PLO) and Montanov[®] 68 (M68)

Formulations	T_l ($\times 10^1$) (h)	K_p ($\times 10^{-4}$) (cm h^{-1})	J ($\times 10^2$) ($\mu\text{g h}^{-1} \text{cm}^{-2}$)	P_1 ($\times 10^3$)	P_2 ($\times 10^{-8}$) ($\text{cm}^2 \text{h}^{-1}$)	C_{ss} ($\times 10^{-1}$) (ng/mL)
MLT plain solution	0.83 (0.73 – 1.00)	0.03 (0.03 – 0.05)	0.03 (0.03 – 0.05)	0.04 (0.04 – 0.07)	3.21×10^{-3} (2.67-3.67) ($\times 10^{-3}$)	–
M68	0.90 (0.04 – 1.72)	8.45 (7.21 – 10.64) ^a	8.52 (7.2 – 10.6) ^a	12.20 (0.43 – 25.06)	1.54 (0.15 – 7.08)	1.59 (0.63 – 3.02) ^a
C940	0.92 (0.51 – 1.94)	9.55 (7.69 – 14.17)	9.67 (7.00 – 14.22)	18.63 (1.59 – 46.61)	0.61 (0.12 – 1.81)	2.10 (0.75 – 3.21)
P407	1.08 (0.57 – 1.54)	0.65 (0.54 – 0.71) ^b	0.71 (0.59 – 0.75) ^b	1.15 (0.68 – 1.67)	0.29 (0.17 – 0.47)	0.14 (0.06 – 0.27) ^b
PLO	1.65 (1.32 – 1.95)	0.83 (0.66 – 1.14) ^{b,c}	0.84 (0.74 – 1.17) ^{b,c}	2.14 (1.39 – 1.90)	0.17 (0.14 – 0.20)	0.18 (0.07 – 0.33) ^{b,c}

Statistically significant differences $p < 0.05$ regarding ^a P407, ^b C940, ^c M68

Table IV Non-modelistic parameters of transmucosal permeation mean time (TPMT), area under de curve (AUC) and permeated amount for each formulation. Poloxamer 407 lecithin organogel (PLO); Poloxamer 407 (P407); Orabase[®] (OB) and sodium carboxymethylcellulose (NaCMC)

	PLO	P407	OB	NaCMC
TPMT (h)	1.20 (0.71–5.48)	1.06 (1.01–1.95)	2.29 (1.29–10.28)	0.79 (0.60–0.95)
AUC ($\mu\text{g/h}$)	1787.82 (362.11–3864.98)	1907.03 (1316.42–2397.81)	882.64 (181.04–1342.09)	2646.84 (2531.16–3758.50)
Permeated (%)	28.43 (5.22–45.81)	30.62 (16.64–32.06)	24.54 (6.31–50.16)	41.14 (53.60–34.11)

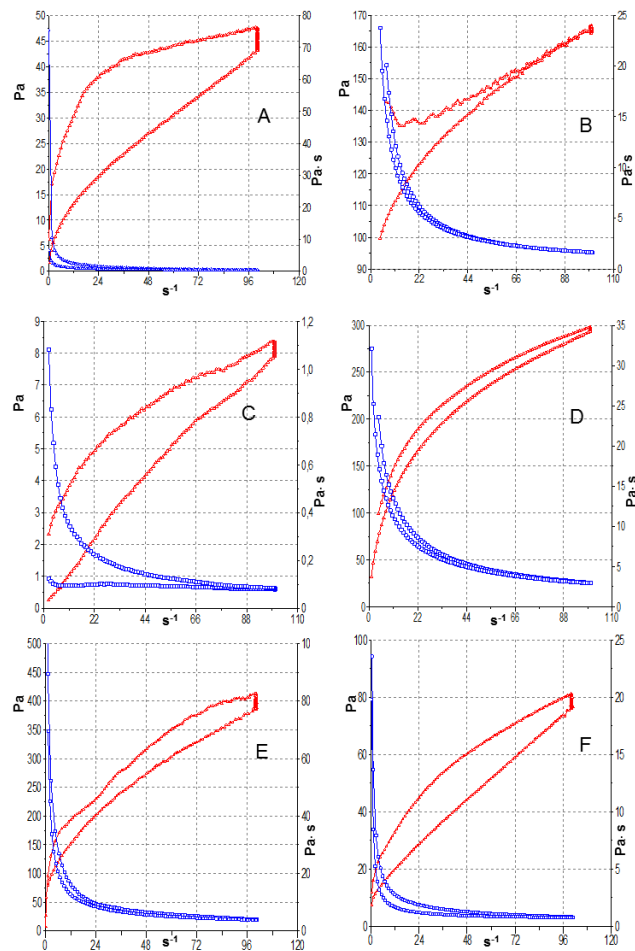


Fig. 1. Flow curves and viscosity curves of the formulations. Shear stress (Pa) versus shear rate (s^{-1}) in red, and viscosity (Pa·s) versus shear rate(s^{-1}) in blue. Panel A, Montanov[®] 68; Panel B, Carbopol[®] 940; Panel C, Poloxamer 407; Panel D, sodium carboxymethylcellulose; Panel E, Poloxamer 407 lecithin organogel.

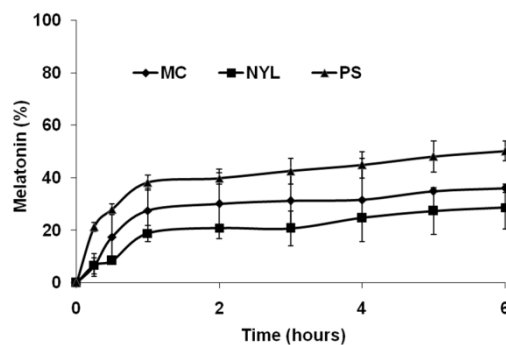


Fig. 2. Membrane selection for in vitro release studies: amount of melatonin (%) transferred through each type of membrane: methylcellulose (MC), nylon (NYL) and polysulfone (PS).

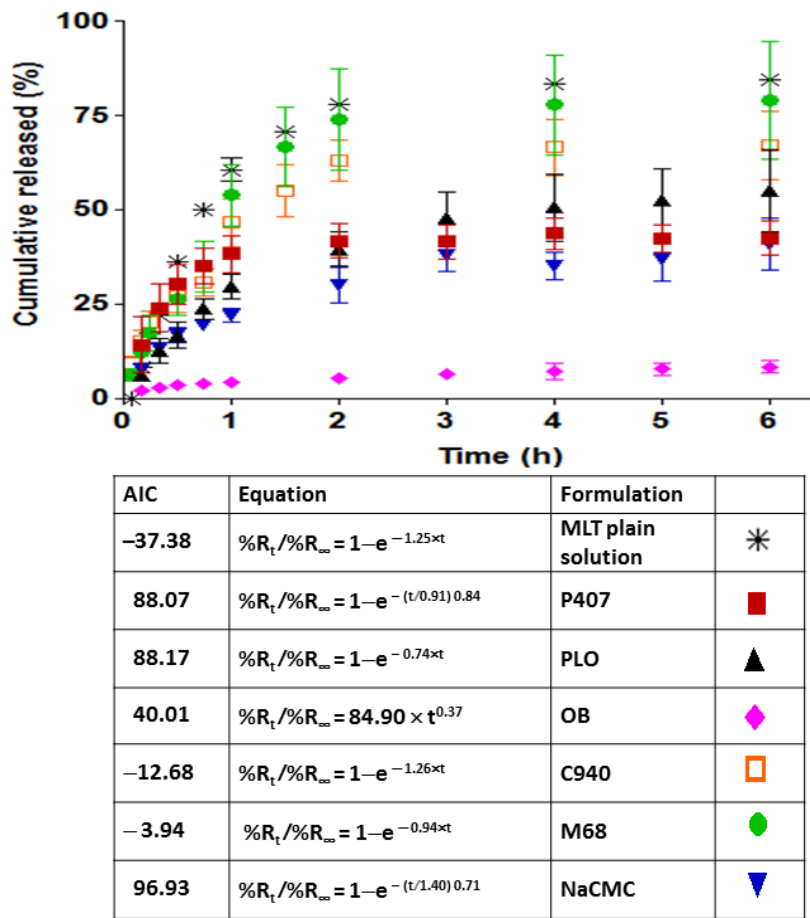


Fig. 3. Melatonin (MLT) release profile from formulations. Poloxamer 407 (P407); Poloxamer 407 lecithin organogel (PLO); Orabase[®] (OB); Carbopol[®] 940 (C940); Montanov[®] 68 (M68) and sodium carboxymethylcellulose (NaCMC). Each point represents mean \pm SD of six replicates. AIC is the Akaike's Information Criterion, equally equations that best fitted experimental data are represented, where $\%R_t/\%R_\infty$ is the rate of release.

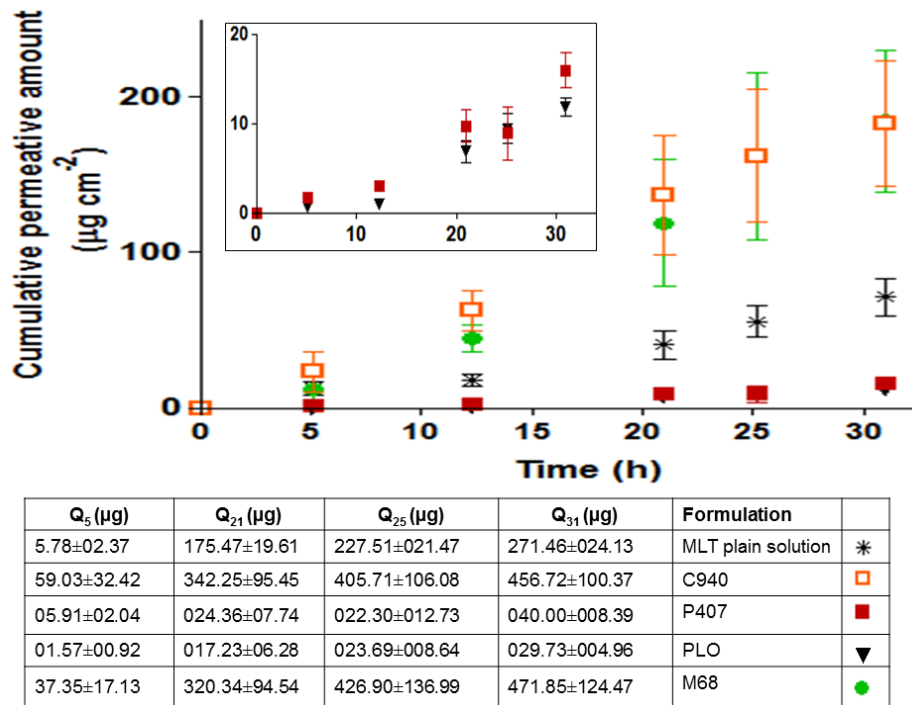


Fig. 4. Comparative cumulative amount of melatonin (MLT) permeated through skin per unit surface area as a function of time. Carbopol[®] 940 (C940); Poloxamer 407 (P407); Poloxamer 407 lecithin organogel (PLO) and Montanov[®] 68 (M68). The inset shows the curves of PLO and P407 for greater understanding. Equally quantities at selected times are depicted (Q_t). Values represent the mean \pm SD of six replicates.

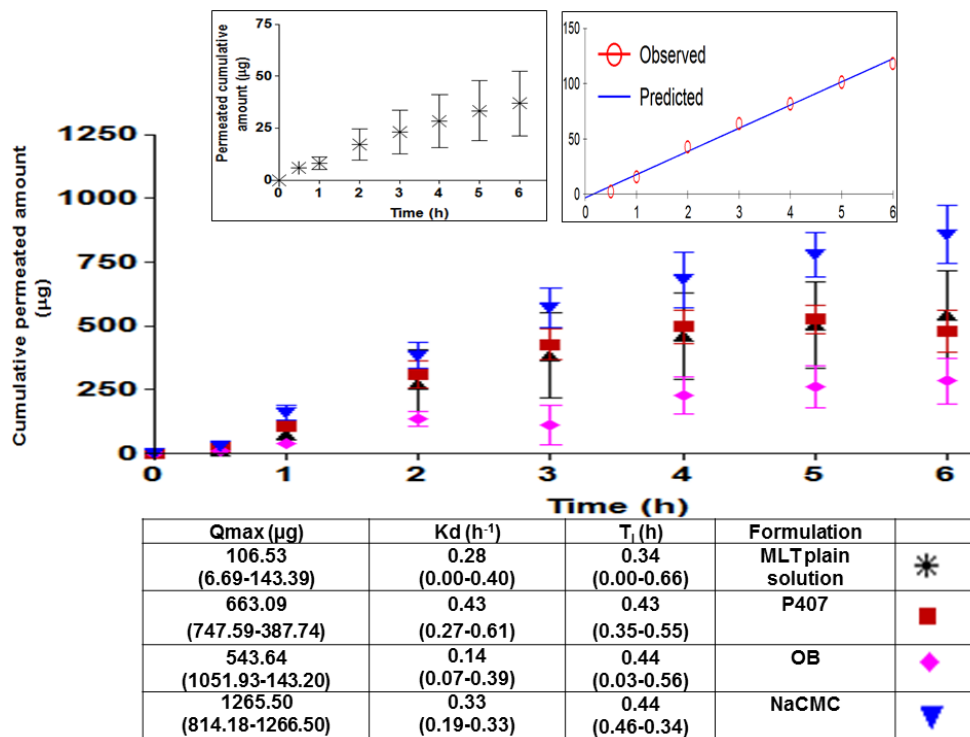


Fig. 5. Comparative cumulative amount of melatonin (MLT) permeated through porcine buccal mucosa per unit surface area as a function of time. Poloxamer 407 (P407); Poloxamer 407 lecithin organogel (PLO); Orabase[®] (OB) and sodium carboxymethylcellulose (NaCMC). Values represent the mean \pm SD of six replicates. The insets show permeation profile of MLT plain solution and PLO fitting to zero order by WinNonLin[®] software. Equally, median modelistic parameters for the first order permeation model are represented, maximum quantity permeated (Q_{max}), permeability coefficient (K_d) and lag time (T_l).

Artículo 2

IN VIVO AND IN VITRO EVALUATION OF THE USE OF A NEWLY DEVELOPED MELATONIN LOADED EMULSION COMBINED WITH UV FILTERS AS A PROTECTIVE AGENT AGAINST SKIN IRRADIATION

(Evaluación del uso in vivo e in vitro de una nueva emulsión que contiene melatonina combinada con filtros UV como un agente protector contra la irradiación de la piel)

**Ana Flo, María L. Garduño, Ana C. Calpena, Adolfina Ruiz,
Beatriz Clares**

Journal of Dermatological Science 2013; 69; 202-214

Índice de impacto: 3.419 (ISI Journal Citation Reports)

Categoría: Bioquímica (Q1): 95/392

Dermatología (Q1): 8/131

Biología molecular (Q2): 152/364

Los resultados de este estudio han sido presentados en formato de póster en los siguientes congresos:

- *Preliminar studies of the antioxidant activity of melatonin formulated with different sunscreens for topical use.* Flo, A.; Calpena, A.C.; Garduño, M.L.; Clares, B. Skin Forum, 12th Annual Meeting, Frankfurt, Alemania, Marzo 2011.
- *Release and rheological study of melatonin emulsions formulated with different sunscreen.* Flo, A.; Calpena, A.C.; Fernández, F.; Lázaro, R.; Clares, B. III Congress of the Portuguese society of pharmaceutical sciences. Oporto, Portugal, Octubre 2011.

Resumen

Objetivo: El objetivo de este estudio fue evaluar la influencia beneficiosa de la MLT en emulsiones para protección solar cutánea combinados con tres filtros ultravioletas comunes.

Métodos: Después de la caracterización de la formulación en términos de reología, se realizaron estudios de estabilidad física. Los estudios de liberación permitieron evaluar el mecanismo de liberación de MLT *ex vivo* y su permeación a través de la piel humana, así como la cantidad de MLT retenida en ésta. Adicionalmente se llevó a cabo un ensayo de actividad antioxidante usando el radical DPPH.

Resultados: El comportamiento reológico de las formulaciones mostró que todas ellas eran fluidos pseudoplásticos con buena estabilidad física. El estudio de liberación mostró una tendencia a la mejora en la liberación de MLT a partir de las emulsiones que incorporaban los filtros UV y siguieron un modelo de Orden 1, aunque el modelo Weibull también dio buenos resultados. La permeación de MLT fue mayor a partir de la emulsión que contenía la combinación de los tres filtros (MMIX). Ésta fue también, la formulación que exhibió la mayor actividad de eliminación de radicales libres.

Conclusión: La formulación MMIX sería una formulación prometedor para la prevención de los efectos adversos indeseables provocados por la radiación UV en la piel debido a que la MLT no sólo actúa como un potente antioxidante *per se*, sino que también es capaz de activar el sistema de protección enzimática endógena contra el estrés oxidativo.



Contents lists available at SciVerse ScienceDirect

Journal of Dermatological Science

journal homepage: www.elsevier.com/jds

In vivo and in vitro evaluation of the use of a newly developed melatonin loaded emulsion combined with UV filters as a protective agent against skin irradiation

Ana Flo Sierra^a, Maria L. Garduño Ramírez^b, Ana C. Calpena Campmany^a, Adolfin Ruiz Martínez^c, Beatriz Clares Naveros^{c,*}

^a Pharmacy and Pharmaceutical Technology Department, Faculty of Pharmacy, University of Barcelona, Joan XXIII avenue, 08028 Barcelona, Spain

^b Chemical Research Centre, Autonomous State University of Morelos, Cuernavaca, Morelos 62209, Mexico

^c Pharmacy and Pharmaceutical Technology Department, Faculty of Pharmacy, University of Granada, Campus de la Cartuja s/n, 18071 Granada, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 14 August 2012

Received in revised form 18 October 2012

Accepted 22 October 2012

Keywords:

Melatonin
Antioxidant
Octyl salicylate
Octyl methoxycinnamate
Benzophenone-3
UV radiation
Photoprotective

ABSTRACT

Background: Melatonin has attracted attention because of their high antioxidant and anticarcinogenic activity. Otherwise, the use of sunscreens is recommended for patients after chemotherapy and radiotherapy treatments or to prevent UV radiation-induced skin damages that may result in pre-cancerous and cancerous skin lesions.

Objective: To evaluate the beneficial influence of melatonin in topical sunscreen emulsions combined with three common ultraviolet filters.

Methods: After the formulation characterization in terms of rheology, stability studies were performed. Release studies let us to evaluate its mechanism of delivery and ex vivo permeation study through human skin, the amount of melatonin retained. The antioxidant activity assay was also carried out, and finally the in vivo photoprotective effect in rats was tested as transepidermal water loss and erythema formation.

Results: The rheological behaviour of formulations was pseudoplastic fluid, all emulsions had good physical stability. Release studies showed a trend of enhancement in melatonin release from emulsions incorporating UV filters and followed a Weibull model. Melatonin permeation was higher from the emulsion containing melatonin combined with a mixture of three ultraviolet filters (MMIX) formulation. Equally this formulation exhibited the highest radical scavenging activity. Finally the photoprotective assay showed that only skin areas treated with this formulation were statistically equivalent to the unirradiated control area.

Conclusion: MMIX formulation would be a promising formulation for preventing the undesirable adverse effects of UV skin irradiation because melatonin not only acts as a potent antioxidant itself, but also is capable of activating an endogenous enzymatic protective system against oxidative stress.

© 2012 Japanese Society for Investigative Dermatology. Published by Elsevier Ireland Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Surgery, chemotherapy and radiotherapy are the first line treatments of choice for removal, palliation or control of different types of tumours. These treatments are quite aggressive because can also damage the surrounding healthy cells and the whole body, so side effects as skin dryness, redness, blisters or ulcerations among other could occur.

Formation of free radicals and reactive oxygen species in the skin following ultraviolet (UV) radiation exposure or X-ray irradiation is now well-documented [1]. UV radiation is a potent initiator of reactive oxygen species (ROS) generation in the skin.

The type(s) of ROS generated, however, depends on the UV wavelength; UVB mainly stimulates the production of $\cdot\text{O}_2^-$ while UVA produces $^1\text{O}_2$ [2]. Reaction of ROS with skin constituents results in multiple adverse effects including DNA damage, cell membrane lipid peroxidation and enzyme inactivation, compromising biological antioxidant defence [3] and activates catabolic cell signalling pathways [4]. Furthermore, reactive oxygen species are responsible for increased skin cancer incidence. Consequently, those patients are encouraged to use sunscreen to decrease the risk of UV-related skin cancer. In this way, clinical data reveal that regular use of a sunscreen can prevent not only sunburn but also reduce carcinogenic processes such as actinic keratosis, solar elastosis, and squamous cell carcinoma [5]. However the efficacy of sunscreens for prevention has been questioned [6]. Numerous papers reported that some common sunscreen components are endocrine active chemicals having an

* Corresponding author. Tel.: +34 958 243904; fax: +34 958 248958.

E-mail address: beatrizclares@ugr.es (B.C. Naveros).

estrogenic effect, causing cancer cells [7], uterotrophic effect [8] and mammary carcinogenesis [9]. Sunscreens also caused an effect on several metabolic parameters such as fat and lipid homeostasis as well as on thyroid hormone production [7]. Furthermore, it was found that when commonly used sunscreens penetrate into the viable layers, they can generate highly reactive oxygen species in the cytoplasm of the nucleated epidermal keratinocytes and the level of reactive oxygen species increases [10].

After absorption of UVA/UVB sunlight radiation, sunscreen active agents undergo photo-fragmentation and/or photo isomerization as well as energy and/or electron transfer, it could result in interaction between the excited molecule and other component of the formulation [11]. Photo isomerization could yield species with less light absorbing capacity than the parent, thus less useful as sunscreen agents or could potentially result in damage to DNA [12], whereas photo-fragmentation leads to dissociate into reactive fragments such as free radicals or reactive intermediates.

Thus, fostering the development of active agents that can be used in addition to UV filters as antioxidants is a challenge [13].

The therapeutic application of antioxidants in photoprotection is based on the photooxidative stress hypothesis, according to which, generation of ROS, depletion of antioxidants, damage of the type caused by ROS and activation of redox sensitive signal transduction pathways can be expected in irradiated skin.

Melatonin (*N*-acetyl-5-methoxytryptamine), a neurohormone secreted primarily at night-time by the pineal gland of mammals by pinealocytes through a sequence of well known reactions from serotonin, exerts surprisingly pleiotropic bioregulatory functions in numerous and extremely diverse biological systems. In last few years, melatonin (apart from above mentioned entities) has attracted attention because of their high antioxidant and anticarcinogenic activity [14,15]. In this way, several clinical reports indicate that melatonin administration, either alone or in combination with traditional radiotherapy, results in a favourable efficacy-toxicity ratio during the treatment of human cancers [16], as well as reduces the X-ray irradiation induced oxidative stress by inhibition of lipid peroxidation [17].

This molecule acts as a strong free radical scavenger, an activator of cytoprotective pathways and, at high concentrations; it attenuates or counteracts oxidative stress [18]. Apart from the above mentioned properties of melatonin, this compound has shown to be an efficacious photoprotective agent via modulation of proinflammatory mediators [19] and has been implicated in vital skin functions such as melanoma control [20]. Even activities of melatonin as a chemotoxicity and ionizing radiation protectant through different biological mechanisms in a number of organs have been documented.

Recent research has revealed that mammalian skin also harbors a complex melatonergic system, that is exposed directly to numerous environmental stressors, whose role could be counter-act external or internal stresses to preserve the biological integrity of the organ and to maintain its homeostasis [21,22]. The physiologic implications of the melatonin may extend beyond a role of the melatonergic system in skin physiology. These capabilities contribute to the maintenance not only peripheral but also global homeostasis. Thus the possibility that melatonergic system is a part of a larger system regulating local and potentially global homeostasis can be suggested [23].

Thus, we hypothesize that topical application of melatonin with an UV filter could provide several properties that would be extremely useful against the oxidative process after exposure radiation treatment (radiotherapy), UV sun exposure, or after using sunscreen.

Based on these considerations, the major aims of the present study were: (i) to develop sunscreen containing melatonin and

three of the most utilized commercial UV filters Octyl Salicylate (OS), Octyl Methoxycinnamate (OMC) and Benzophenone-3 (3Bph) (ii) to characterize the formulations in terms of pH, rheological properties and stability; (iii) to evaluate their *in vitro* release behaviour; (iv) to investigate the *ex vivo* permeation across human skin and skin retention of melatonin; (v) to assess the antioxidants properties of the formulations and finally; (vi) to study their *in vivo* photoprotective effect in rats.

2. Material and methods

2.1. Materials

Melatonin, alkylpolyglucoside non ionic emulsifier cetaryl glucoside and cetaryl alcohol (Montanov[®] 68) (Mv), medium chain triglycerides (MCTs) and perhydroesqualene (PHE) were purchased from Fagron Iberica, (Barcelona, Spain). Octyl salicylate, octyl methoxycinnamate and benzophenone-3, were obtained from Merck (Barcelona, Spain). Solvents and reagents used were: ethanol and methanol HPLC quality from Panreac (Barcelona, Spain). Double distilled water was used after filtration in a Milli-Q[®] Gradinet A10 system apparatus (Millipore Iberica S.A.U., Madrid, Spain) to a resistivity of 18.2 MΩ cm.

2.2. Emulsions preparation

Five different emulsions with different UV filters and the same amount of melatonin were formulated and designated as MLT (melatonin without UV filters), MOS (melatonin and octyl salicylate), MOMC (melatonin and octyl methoxycinnamate), M3Bph (melatonin and benzophenone-3), and MMIX (melatonin, octyl salicylate, octyl methoxycinnamate and benzophenone-3). Quantitative composition of each formulation is shown in Table 1.

For this purpose phases B and C were heated separately until reach a temperature of 70 ± 2 °C. Phase C was incorporated on phase B and were cooled with stirring according to the procedure previously described by Savić et al. [24] until an emulsion was obtained. Phase A was added in the cooling phase of the emulsion preparation at about 35 °C whilst mixed at 500 rpm (1 min) and the emulsion was homogenized at 300 rpm to the room temperature.

2.3. pH measurements

pH values were measured by immersing the probe directly into the sample using the Crison 501 digital pH/mV-meter (Crison, Spain) with the electrode for viscous samples. All measurements were performed initially, 6 and 12 months storage at room temperature, in triplicate.

Table 1
Composition of developed formulations.

Formulations	MLT (%)	MOS (%)	MOMC (%)	M3Bph (%)	MMIX (%)
Phase A					
Melatonin	1	1	1	1	1
Phase B ^a					
Octyl salicylate	–	5	–	–	5
Octyl methoxycinnamate	–	–	5	–	5
Benzophenone-3	–	–	–	5	5
Medium chain triglycerides	5	5	5	5	5
Perhydroesqualene	5	5	5	5	5
Montanov [®] 68	5	5	5	5	5
Phase C					
q.s. water	100	100	100	100	100

^a UV filters amounts are below usual concentrations established by the COLIPA.

2.4. Rheological characterization

Assays were run at increasing shear rates 25, 50 and 100 s⁻¹. The device consisted in a rotational rheometer HAAKE Rheostress 1 (Thermo Fisher Scientific, Karlsruhe, Germany) equipped with cone-plate geometry (diameter 35 mm and 2° angle). Different gaps between plates were tested and a separation of 0.5 mm was selected and provided with air bearing of fourth-generation and “Digital Signal Processor (DSP)”.

All measurements were carried out in triplicate at 25 °C. Each sample was characterized 24 h after its preparation and subsequently recorded after 6 and 12 months storage at room temperature.

The models of Newton, Bingham, Ostwald-De-Waele, Herschel-Bulkley and Casson, were fitted to the rheological data obtained from MMIX formulation [25]. The rheometer was connected to a computer provided with the software HAAKE RheoWin® Job Manager V. 3.3 to carry out the test and RheoWin® Data Manager V. 3.3 (Thermo Electron Corporation, Karlsruhe, Germany) to carry out the analysis of the obtained data. Prism®, V. 3.00 software (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA) was used for the fitting calculation.

2.5. Stability study

The first accelerated test concerned stability at elevated temperatures, (15 days at 50 °C), and the second concerned stability under centrifugation, 15 min at 5000 rpm. In addition samples were stored at room temperature for 6 and 12 months to examine real time stability.

2.6. In vitro release study and kinetic evaluation

In vitro release studies were performed using vertical diffusion Franz cells (FDC-400) which were supplied by Vidra-Foc (Barcelona, Spain). Three types of membranes (0.45 μm pore size) were tested: methylcellulose (MC) (Teknokroma, Barcelona, Spain), nylon (NYL) (Waters Corporation, Milford, MA, USA) and polysulfone (PS) (Pall Corporation, Gelman Sciences, Ann Arbor, MI, USA).

Ethanol/water (60:40) was used as receptor phase perfect sink conditions in the whole experiment. It was constantly stirred with a small magnetic bar and thermostated at 32 ± 1 °C throughout the experiments. On the donor phase were placed 100 mg of each formulation.

Samples of the receiver compartment were extracted after elapsed times of 0.167, 0.250, 0.500, 0.750, 1, 1.5, 2, 4 and 6 h, replaced with an equal volume of fresh solution to ensure sink conditions in six replicates.

The data obtained from in vitro release studies were fitted to different kinetic models: zero order, first order, Higuchi, Weibull and Korsmeyer-Peppas [26].

The Akaike's Information Criterion (AIC) was determined for each model as it is an indicator of the model's suitability for a given dataset [27].

2.7. Human skin penetration experiments

2.7.1. Skin

Human skin from abdominal plastic surgery of healthy patients was used as a permeation membrane. Skin was cleaned and stored at -25 °C until further use. For the experiment skin was cut using an Aesculap GA 630 dermatome, (Aesculap, Tuttlingen, Germany) into 400 μm thick pieces at room temperature [28]. The experimental protocol was approved by the Bioethics Committee of the Barcelona SCIAS Hospital

(Spain), and written informed consent forms were provided by volunteers.

Each skin sample was measured in triplicate using a trans epidermal water loss (TEWL) measurement DermaLab® module (Cortex Technology, Hadsund, Denmark) to check the skin integrity [29,30]. Skin with TEWL value higher than 10 g m⁻² h⁻¹ was ruled out from the experiment.

2.7.2. Permeation study

Permeation study was performed on vertical amber glass Franz-type diffusion cells (FDC 400, Crown Glass, Somerville, NY, USA). The excised skin was mounted between donor and receptor compartment of Franz diffusion cell, avoiding bubbles formation, with stratum corneum side facing the donor compartment and the dermis facing the receptor medium receiver compartment, which was filled with ethanol/water (60:40; v/v). Samples of 100 mg of each formulation were applied to the donor compartment and sealed by Parafilm® immediately to prevent water evaporation. Temperature was kept at 32 ± 0.5 °C to mimic in vivo conditions by a circulating-water jacket and stirred with a magnetic rotor at a speed of 700 rpm. Aliquots of 300 μL were withdrawn at regular time intervals (up to 25 h) and replaced with the same volume of ethanol/water (60:40; v/v). The samples were taken into 1.5 mL amber vials and kept at -20 °C until analyzed by high-performance liquid chromatography (HPLC).

2.7.3. Skin permeation parameters

The cumulative amount of melatonin permeated (Q_t) through excised human skin was plotted as function of time and determined based on the following equation:

$$Q_t = \frac{V_r \times C_t + \sum_{i=0}^{t-1} V_s \times C_i}{S} \quad (1)$$

where C_t is the drug concentration of the receiver solution at each sampling time, C_i the drug concentration of the i sample, and V_r and V_s the volumes of the receiver solution and the sample, respectively, S represents the skin surface area (2.54 cm²).

The slope and intercept of the linear portion of the plot was derived by regression using the Prism®, V. 3.00 software (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA).

Melatonin fluxes (J , μg cm⁻² h⁻¹) through the skin, from the assayed formulations were calculated from the slope of linear portion of the cumulative amounts permeated through the human skin per unit surface area versus time plot, and the extrapolation of this line will intercept with the X-axis at a time equal to lag time (T_l , h).

The permeability coefficients (K_p , cm h⁻¹) were obtained by dividing the flux (J) by the initial drug concentration (C_0) in the donor compartment, and it assumed that under sink conditions the drug concentration in the receiver compartment is negligible compared to that in the donor compartment.

$$K_p = \frac{J}{C_0} \quad (2)$$

Once parameters J_s , T_l and K_p are calculated, partition parameter P_1 and the diffusion parameter P_2 can be obtained from the following equations:

$$K_p = P_1 \times P_2 \quad (3)$$

$$T_l = \frac{1}{6} \times P_2 \quad (4)$$

In order to evaluate the synergetic effect of the mix of the sun filters on the penetration enhancing effect of the studied

formulations, the enhancer synergic index (SI) was calculated according to the following formula:

$$SI = \frac{K_p \text{ without synergy}}{K_p \text{ with synergy}} \quad (5)$$

2.7.4. Skin retention

At the end of the permeation study, the amounts of melatonin remaining on the skin were quantified. The skin was removed from the Franz cells, cleaned with gauze soaked in a 0.05% solution of dodecyl sulphate and washed in distilled water. The permeation areas of the mucosa were cut and weighed. Melatonin contained in the skin was extracted with ethanol/water (70:30; v/v) mixture during 20 min under cold sonication in an ultrasound bath. The resulting solutions were centrifuged (1500 rpm) for 10 min and melatonin levels (expressed as $\mu\text{g g}^{-1} \text{cm}^{-2}$ of skin) were measured by HPLC yielding the amount of melatonin retained in the skin [31].

2.7.5. HPLC analysis

The amount of melatonin in samples was quantified using a high-performance liquid chromatography (HPLC) validated according to international guidelines. All HPLC assays were performed isocratically at room temperature. The HPLC system consisted of a Waters 515 pump (Waters, Milford, MA, USA) with UV-vis 2487 detector (Waters, Milford, MA, USA) set at 223 nm (I_{max}). A reverse-phase column SunFire C18 3.5 μm column (150 mm \times 4.6 mm) (Waters Corporation, Milford, MA, USA), with a mobile phase consisting of methanol:water (50:50), at a flow rate of 1 mL min^{-1} , an injection volume of 50 μL was used. Melatonin retention time was 4.9 min. This method was previously validated with good results.

2.8. Antioxidant activity

Samples 1–7 were elaborated at the same concentration of 1000 ppm of each component, in order to reach equivalent antioxidant activity comparisons. Samples 8–17 were elaborated in such a way to get equivalence in their antioxidant activity related to melatonin, for this reason in samples 9–12 and 14 (corresponding to MLT, MOS, MOMC, M3Bph and MMIX) the concentration of melatonin was 1000 ppm, and samples without melatonin, 8, 13 and 15–17 the quantity of components were in accordance as if melatonin would have been included at a concentration of 1000 ppm. Antioxidant activity of emulsions was evaluated using the 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) (Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim, Germany) free radical scavenging method by slightly modified test of Brand-Williams [32] in an UV-vis light Spectronic Genesys 8 spectrophotometer (Spectronic Instruments Inc., Rochester, NY, USA) at 515 nm.

First 17 samples were kept in the dark for 90 min at room temperature and then the decrease and the increase in absorption was measured. The others 17 samples were exposed to the constant UV-WL radiation (366 nm) from a portable lamp UVGL-25 Mineralight 254/366 nm (UVP, Inc., San Gabriel, CA, USA), as soon as the free radical DPPH was added.

The readings of the absorbance of formulations were performed at time intervals for up to 120 min because use of sunscreen among the population follows a regular basis, every 1.5–2 h [33]. The antioxidant activity was expressed as the RSA% (Radical Scavenging Activity), calculated as follows:

$$RSA\% = \frac{A_0 - A_s}{A_0} \times 100 \quad (6)$$

where A_0 is the absorbance of the control and A_s is the absorbance of the samples at 515 nm. The experiment was performed in

triplicate. Similar procedures were performed with samples after a storage period of 12 months.

2.9. Animals and experimental protocol

The studies were conducted under a protocol in accordance with the Mexican Official Norm for Animal Care and Handling (NOM-062-ZOO-1999) and Ethical Guidelines for Investigation of Experimental Pain in Conscious Animals as issued by the International Association for the Study of Pain [34].

Male Wistar rats (200–250 g) were purchased from Harlan S.A. de C.V. (Mexico) and were subjected to a quarantine period of 7 days on arrival. The animals were housed in plastic cages with soft bedding with access to controlled diet and tap water ad libitum. The temperature was kept at 24 ± 1 °C and the relative humidity was kept at 50–60%. Artificial lighting was used to provide 12 h light and 12 h dark every 24 h.

Experiments were conducted on animals that had been handled daily and that had been familiarized with the experimenter, the experimental environment, and the testing equipment for 3 days (30 min of handling per day). Animals were anesthetized with sodium pentobarbital intraperitoneally (60 mg kg^{-1}) and the back of each rat was shaved. Hairless rats were randomly designed to different groups with 3 mice in each group and topically treated on the dorsal surface with 100 mg of each formulation (MLT, MOS, MOMC, M3Bph, MMIX). The formulations were applied 1 h and 5 min before irradiation of the dorsal surface and after irradiation. Finally, eight groups ($n = 3$) were tested. Group 1 = non-irradiated control, Group 2 = irradiated control, Group 3 = irradiated control, treated with unloaded emulsion system (without actives), Group 4 = irradiated and treated with 100 mg of MLT emulsion, Group 5 = irradiated and treated with 100 mg of MOS emulsion, Group 6 = irradiated and treated with 100 mg of MOMC emulsion, Group 7 = irradiated and treated with 100 mg of M3Bph emulsion and Group 8 = irradiated and treated with 100 mg of MMIX emulsion.

2.9.1. Evaluation of skin irritation

The emulsions MLT, MOS, MOMC, M3Bph and MMIX were applied topically and non-occlusively on a limited area of the dorsal skin of hairless mice once a day for 2 days. Skin irritation was evaluated as erythema formation. Skins of untreated animals or treated with the unloaded emulsion vehicle were used as controls. Skin redness measured with a Mexameter[®] MX16 (Courage & Khazaka Electronic GmbH, Cologne, Germany).

2.9.2. Irradiation

The UV source of irradiation consisted of a UVGL-25 Mineralight[®] lamp (UVP, Inc., San Gabriel, CA, USA) mounted 10 cm above the mice-supporting apparatus and emitting a continuous light spectrum between 254 and 366 nm. UVB output was measured using an UVX Digital Radiometer (UVP, Inc., San Gabriel, CA, USA) with the UVB (310 nm) sensor placed in the same position and at the same distance from the source. The UVB irradiation rate was 0.27 mW cm^{-2} and the dose used was 2.50 J cm^{-2} .

2.9.3. Protective effect

The protective effect of the formulations after irradiation (3 h) was assayed by biophysical techniques: TEWL and erythema index. TEWL was determined by a DermaLab[®] module (Cortex Technology, Hadsund, Denmark) and erythema index was measured by reflectance spectrophotometry using a Mexameter[®] MX16 (Courage & Khazaka Electronic GmbH, Cologne, Germany), related to the haemoglobin content [35].

2.10. Statistical analysis

Data were statistically analyzed by one-way ANOVA, followed by Bonferroni's multiple comparison *t*-test. The level of significance was set at $p < 0.05$ using Prism[®], V. 3.00 software (GraphPad Software, Inc., San Diego, CA, USA).

3. Results and discussion

3.1. Characterization of formulations

pH was slightly acidic in all the freshly made up formulations and indicated a mild nature of the surfactant (ranging from 6.23 ± 0.1 to 6.53 ± 0.06). No significant changes over time were observed in either formulation. The acidity of the skin ranges from pH 4–6, thus both findings make these formulations suitable for topical application [36].

The rheological characterization was conducted in order to evaluate changes induced by the addition of UV filters. The effect of the shear rate on the viscosity, analyzed 24 h after preparation of the formulations at room temperature are presented in Table 2.

MLT, MOS, MOMC and M3Bph formulations, showed statistically higher viscosity values than MMIX formulation. The addition of filter did not produce significant alterations in the viscosity of the formulations; only in MMIX formulation the addition of filters provoked a statistically significant viscosity decrease ($p < 0.05$).

The flow and viscosity curves of the emulsions (shear stress versus shear rate in red, and viscosity versus shear rate in blue) are shown in Fig. 1. When the shear rate increases, the viscosity values decrease, and this tendency is exhibited in all emulsions. This rheological behaviour could be described as typical for a non-Newtonian, pseudoplastic fluid.

No significant changes in rheological characteristics were observed in either formulation. In fact, the five samples exhibited pseudoplastic flow and thixotropic behaviour (Fig. 2). This obtained behaviour and flow is a desirable attribute for topical and sunscreen formulations, so that they produce a coherent protective film over the skin surface. Newtonian materials do not behave in this way, because when spread on the skin they run very quickly, reducing the protective film [37]. The pseudoplastic material, however, can break down for easy spreading, and the applied film can gain viscosity instantaneously to resist running [38].

Table 2

Viscosity and pH values of formulations containing melatonin (MLT), melatonin and octyl salicylate (MOS), melatonin and octyl methoxycinnamate (MOMC), melatonin and benzophenone-3 (M3Bph), melatonin, octyl salicylate, octyl methoxycinnamate and benzophenone-3 (MMIX). Results are the mean of three replicates \pm SD.

Formulation	Shear (s ⁻¹)	Mean viscosity \pm SD (m Pa s)	CV (%)	pH \pm SD
MLT	25	1.22 \pm 0.20	16.57	6.25 \pm 0.05
	50	0.74 \pm 0.16	21.17	
	100	0.44 \pm 0.12	28.28	
MOS	25	1.29 \pm 0.02	1.90	6.26 \pm 0.06
	50	0.78 \pm 0.01	1.52	
	100	0.47 \pm 0.01	1.51	
MOMC	25	1.09 \pm 0.07	6.78	6.33 \pm 0.06
	50	0.79 \pm 0.06	7.70	
	100	0.46 \pm 0.04	8.32	
M3Bph	25	1.53 \pm 0.03	2.20	6.53 \pm 0.06
	50	0.94 \pm 0.03	2.93	
	100	0.56 \pm 0.02	3.11	
MMIX	25	0.75 \pm 0.13 ^a	17.13	6.23 \pm 0.1
	50	0.50 \pm 0.09 ^a	19.04	
	100	0.24 \pm 0.04 ^a	15.36	

^a Significant differences between groups $p < 0.05$.

The hysteresis area (thixotropy), a pseudoplastic natural characteristic, was observed in the rheograms obtained. The presence of only one filter did not alter this area of the formulations, however, the addition of three filters induced statistically lower thixotropy value than the other formulations (Fig. 2). The graphics for MLT, MOS, MOMC and M3Bph are similar. Therefore only MOMC and MMIX are presented in Fig. 2.

Samples after 6 and 12 months did not show significant changes in rheological profiles (data not shown).

On the basis of these results and those previously commented about the characterization of the formulations it can be reported that formulations are stables during the period of time of the experiment.

There is an optimal value for thixotropy and it is important to find the optimum thixotropy value for the sunscreen formulations. With lower values, the spreadability is insufficient to permit good distribution of the sunscreen. Above the optimum thixotropy, there is insufficient recovery of the structure to give a product with a film evenly distributed, as it continues to flow into the wrinkles of the skin [36]. Thus, ideal formulations would be those presenting lower thixotropy, in this way thixotropy value of MMIX formulation was 65.37 Pa s^{-1} ($A(1) = 385.2 \text{ Pa s}^{-1}$, $A(2) = 23.22 \text{ Pa s}^{-1}$ and $A(3) = 343 \text{ Pa s}^{-1}$). These results are in accordance with those reported by Gaspar and Campos [39].

Rheological parameters were calculated for Newton, Bingham, Ostwald-De-Waele, Herschel-Bulkley and Casson models. Table 3 shows the values of each parameter and the coefficient of regression. The objective of this study was to identify the model that provided the best overall match of the experimentally observed rheological data. The criterion for selecting the most appropriate model was based on the best fitting model which had the higher correlation coefficient of the linear regressions (r^2) thus, statistically described best the rheological behaviour. Ostwald-De-Waele and Herschel-Bulkley models gave good fits to the experimental rheograms and the Newton model provided the worst overall prediction of rheological behaviour. After analyzing chi-square values of fit (1.304 for Ostwald-De-Waele model and 1.19 for Herschel-Bulkley model), it was concluded that Ostwald-De-Waele was statistically the best adequate of the fitted functions that represented the rheological behaviour of the MMIX emulsion. This model has been found to be the most suitable for fitting experimental data for oil in water emulsions by others authors [40].

3.2. Stability of formulations

The instability could become manifest through a variety of physicochemical destabilizing processes, such as creaming (or sedimentation), flocculation, coalescence or phase inversion. The stability of the emulsions was assessed by visual observation of the possible phase separation or other phenomena. After 15 days of storage at 50 °C macroscopic observations did not reveal any sign of instability.

Equally centrifugation test is usually used to determine the stability of the developed emulsions. This test showed that all emulsions had good physical stability because no phase separation, creaming, cracking or precipitation signs were observed upon centrifugation.

The 6 and 12 months stability study at room temperature showed that after visual observation no phase separation took place. Rheological parameters τ_0 , K and n were determined with the aim of checking the effect of passing time on the stability of these emulsions and no significant changes were observed ($p < 0.05$). pH values either exhibited statistically significant changes after storage period. It was concluded that all formulations were stables.

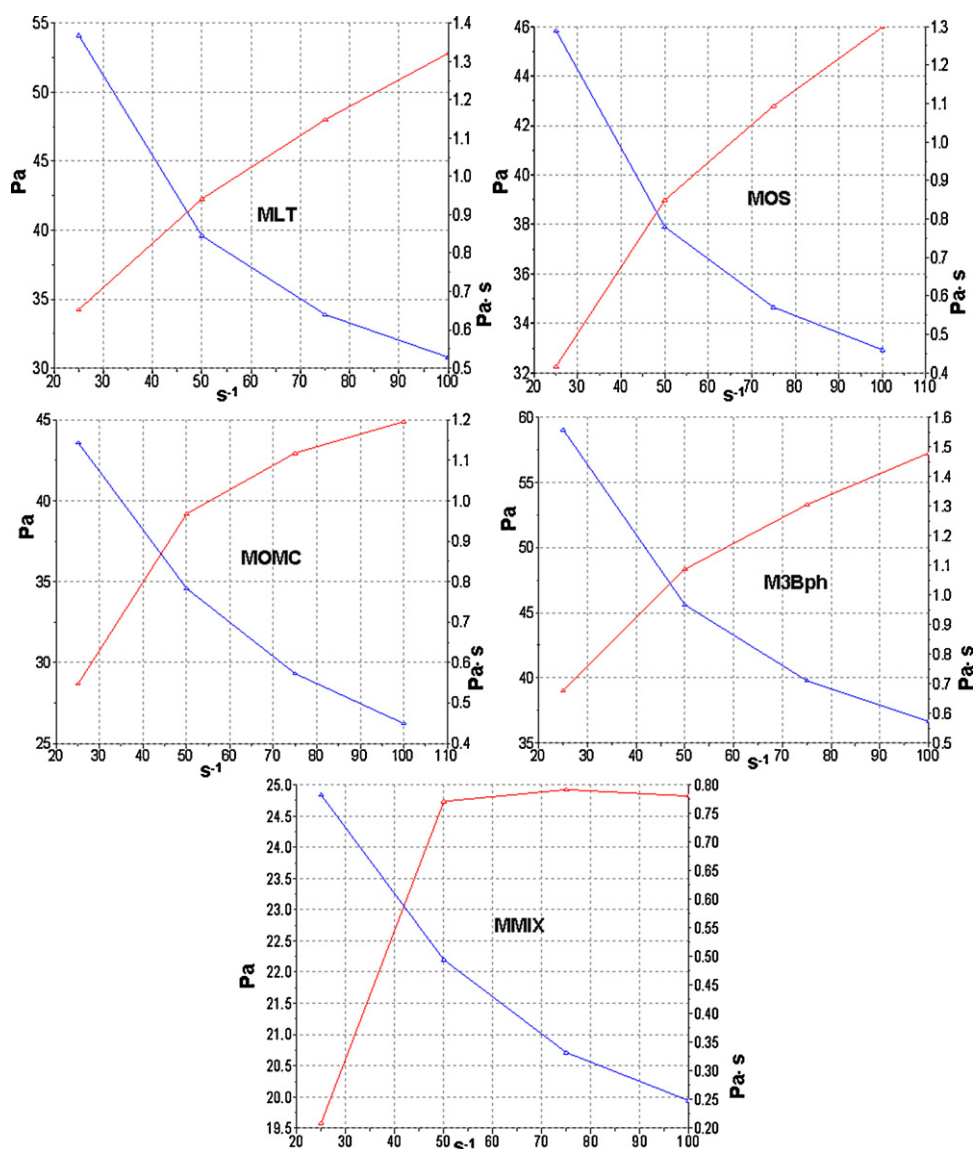


Fig. 1. Flow curves and viscosity curves of the formulations. Shear stress (Pa) versus shear rate (s⁻¹) in red, and viscosity (Pa s) versus shear rate(s⁻¹) in blue.

3.3. In vitro release study

All membranes allowed the passage of melatonin, however after 1 h the nylon and methylcellulose membranes had reached 18% and 27% respectively. In contrast, transfer was higher through the polysulfone membrane. Approximately 40% of the dose had crossed the membrane after 1 h. Therefore, polysulfone was the selected as membrane for the release studies.

The release profiles indicate a two step process. The initial step shows a burst release which can be attributed to the surface associated drug, followed by a slower sustained release phase for all melatonin loaded emulsions. The phenomenon exhibits that the release of melatonin is controlled by diffusion. It was observed that 80% drug was released from emulsions within 2 h.

In spite of lack of statistical differences ($p > 0.05$) among assayed emulsions, there is a trend of enhancement in melatonin release from emulsions incorporating one or three UV filters (MOS, MOMC, M3Bph and MMIX) starting at 5 min until the 2nd hour of the experiment, possibly due to a change in melatonin thermodynamic activity upon lipophilia increase.

Model fitting showed that all the formulations followed a first order model, which had the smaller value of AIC (Table 4) and thus,

statistically described best the drug release mechanism. This means that the melatonin is delivered at a rate proportional to the concentration gradient driving the transfer of drug movement, based on the first Ficks law, where the released amounts are directly proportional to the amounts remaining into the dosage form.

As it could be expected, the diffusion of melatonin from emulsions was fast, with a high release constant between 1.25 and 2.20 h⁻¹, reaching about 80% of deliverance after 2 h. This value is sustained until 24 h; therefore, the emulsion vehicle does not limit the melatonin release.

The drug release was also found to be very close to the Weibull equation with a R_{∞} value from 74.92 to 99.4 (% melatonin). On the use of the Weibull function for the discernment of drug release mechanisms, estimates for $\beta \leq 0.75$ indicate Fickian diffusion in either fractal or Euclidian spaces while a combined mechanism (Fickian diffusion and swelling controlled release) is associated with β values in the range $0.75 < \beta < 1$. For values of β higher than 1, the drug transport follows a complex release mechanism [41]. For the assayed emulsions, β values ranged from 1.23 to 2.00 (Table 4). These β values have been described as a sigmoid curve indicative of complex release mechanism, the rate of release does

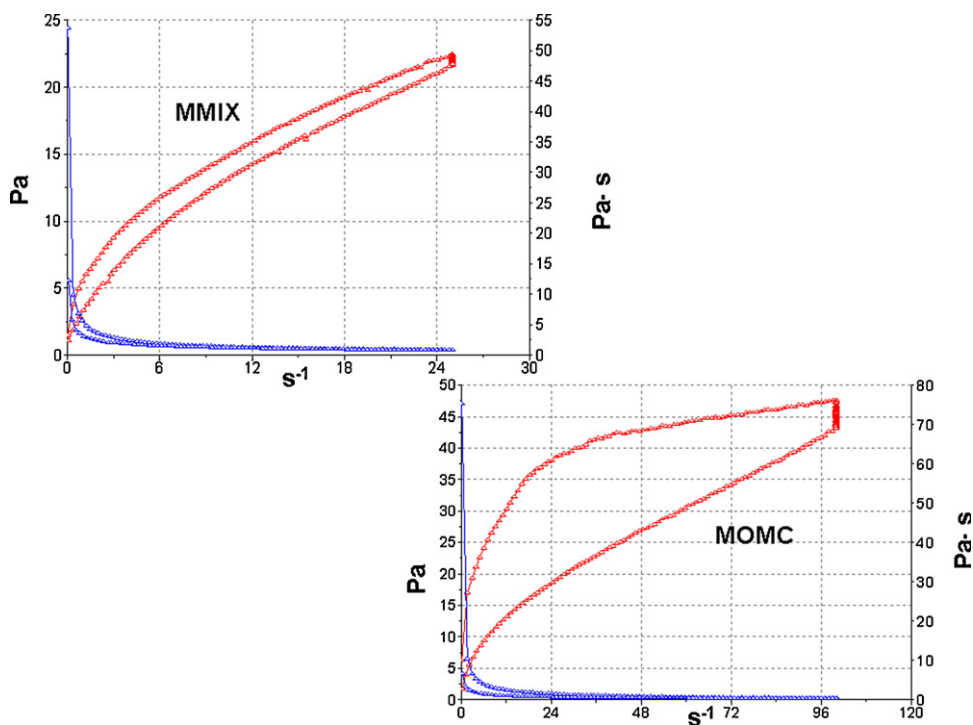


Fig. 2. MIX and OMC formulations rheograms. It shows the shear stress (Pa) (in red) and the viscosity (Pa s) (in blue).

not change monotonically. In fact, the release rate initially increases nonlinearly up to the inflection point and thereafter decreases asymptotically.

The mathematical description of the entire drug release process is rather difficult because of the number of physical characteristics that must be taken into consideration. There are too many factors involved. Among these it could be include the viscosity. So, it was also studied the existence of a correlation between the viscosity and the value of constant release (k). Obtained results showed a good hyperbolic correlation between the viscosity and k value with r^2 value of 0.9768 for three of the five assayed formulations.

3.4. Ex vivo permeation experiments through human skin

After 15 h approximately, a nearly linear relationship between the cumulative amounts of drug permeated versus time could be observed, indicating that the skin integrity was maintained throughout the experiment and the permeation rate was constant. Furthermore, a fuller assessment of the skin irritant potential of the vehicles could be provided by measuring an additional skin parameter as barrier function TEWL [42]. The determination of the TEWL before and after the studies, confirmed that no damage to the human skin membranes was caused during this experiment.

Table 3
Rheological parameters of the melatonin, octyl salicylate, octyl methoxycinnamate and benzophenone-3 formulation (MMIX) obtained by fitting the experimental data to the rheological models: Newton, $\tau = \gamma \dot{\gamma}$; Bingham, $\tau = \tau_0 + \eta_p \times \dot{\gamma}$; Ostwald-de Waele, $\tau = k \times \dot{\gamma}^n$; Herschel-Bulkley, $\tau = \tau_0 + k_1 \times \dot{\gamma}^n$ and Casson $\tau^{1/2} = \tau_0^{1/2} + k_1 \times \dot{\gamma}^{1/2}$ for the ascendant and descendent stretch. Where τ is the shear stress (Pa), $\dot{\gamma}$ is the viscosity (Pa s), $\dot{\gamma}$ is the shear rate (1 s^{-1}), τ_0 is the yield shear stress (Pa), η_p is the consistency index (Pa s n), k is the consistency (s) and n is the flow index, the different values of n indicate the fluid behavior. For a Newtonian fluid, $n = 1$. If $n < 1$, the fluid is called pseudoplastic; if $n > 1$, the fluid is dilatant.

	Ascendant stretch							Descendent stretch						
	η	τ_0	η_p	n	K	K_1	r^2	η	τ_0	η_p	n	K	K_1	r^2
Newton	1.09	-	-	-	-	-	0.6856	1.00	-	-	-	-	-	0.8902
Bingham	-	7.00	0.67	-	-	-	0.978	-	4.53	0.73	-	-	-	0.9843
Ostwald de Waele	-	-	-	0.45	5.27	-	0.9996	-	-	-	0.57	3.42	-	0.9998
Herschel-Bulkley	-	1.02	-	0.49	-	4.47	0.9999	-	-0.25	-	0.56	-	3.59	0.9998
Casson	-	4.00	-	-	-	0.32	0.9948	-	2.09	-	-	-	0.43	0.9956

Table 4
Mean parameters \pm SD, obtained after fitting the release data from the formulations to different release models, where K is the release rate constant, β is the shape parameter, R_∞ is the total percentage drug released and CV is the coefficient of variation, AIC_1 is the Akaike's Information Criterion for first order model and AIC_w for Weibull function.

	First order				Weibull			
	k (h^{-1})	R_∞ (%)	AIC_1	CV (%)	β	R_∞ (%)	AIC_w	CV (%)
MLT	1.25 \pm 0.048	84.06 \pm 1.980	-39.36	3.85	1.23 \pm 0.286	83.91 \pm 2.090	-37.38	2.36
MOS	1.70 \pm 0.058	89.65 \pm 1.701	-41.52	3.42	1.10 \pm 1.169	89.66 \pm 1.792	-39.52	1.91
MOMC	2.20 \pm 0.079	74.92 \pm 1.355	-41.01	3.53	2.00 \pm 1.085	74.97 \pm 1.363	-39.01	1.81
M3Bph	1.55 \pm 0.094	74.92 \pm 3.191	-30.08	3.06	1.39 \pm 1.137	92.05 \pm 3.245	-28.08	3.48
MMIX	1.73 \pm 0.094	83.25 \pm 2.502	-32.31	5.42	1.75 \pm 1.497	83.07 \pm 2.536	-30.32	3.01

Table 5

Lag time (T_l), permeability coefficient (K_p), flux (J), partition coefficient (K), diffusion constant (D) and the synergic index (SI) for the assayed formulations. Results are shown as the median and range (min–max).

Formulations	T_l ($\times 10^1$) (h)	K_p ($\times 10^{-3}$) (cm h^{-1})	J ($\times 10^1$) ($\mu\text{g h}^{-1} \text{cm}^{-2}$)	K	D ($\times 10^{-5}$) ($\text{cm}^2 \text{h}^{-1}$)	SI
MLT	0.83 (0.73–1.00)	0.34 (0.32–0.49)	0.34 (0.32–0.49)	0.42 (0.38–0.73)	3.21 (2.67–3.67)	0.30
MOS	1.16 (0.93–1.31)	0.51 (0.23–0.66)	0.51 (0.24–0.62)	0.92 (0.34–1.41)	2.24 (1.89–2.80)	0.45
MOMC	1.09 (0.90–1.12)	0.38 (0.25–0.72)	0.38 (0.25–0.72)	0.62 (0.41–0.98)	2.46 (2.39–2.95)	0.34
M3Bph	1.07 (0.97–1.16)	0.41 (0.31–1.01)	0.41 (0.31–1.01)	0.68 (0.51–1.48)	2.50 (2.31–2.75)	0.37
MMIX	1.36 (1.25–1.45)	1.13 (0.46–1.34)	1.13 (0.46–1.34)	2.46 (0.87–2.74)	1.96 (1.84–2.14)	1.00

The lag time (T_l), permeability coefficient (K_p), flux (J), partition coefficient (K), diffusion constant (D) and synergic ratio (SR) of melatonin were calculated from the cumulative amounts of drug permeated through the skin plotted versus time in steady state conditions (Table 5). A nonparametric analysis of the experimental data was performed in this study and the mean profile of melatonin permeated versus time after MMIX formulation application is greater than the other ones.

Samples with similar rheological characteristics have also shown comparable fluxes and permeation coefficients (from 3.4 to $5.1 \mu\text{g h}^{-1} \text{cm}^{-2}$ and 0.34 to $0.51 \times 10^{-3} \text{cm h}^{-1}$ respectively ($p > 0.05$)) (Table 5). They were significantly smaller than for MMIX, starting from the 18 h of experiment ($p < 0.05$).

When relating our permeation results to rheological findings, it appears that slight differences in rheological profiles are not of decisive influence on the melatonin permeation. However, a distinct rheological profile of MMIX (lower viscosity under shear) (Table 2) was accompanied by the highest flux and permeation coefficient ($J = 11.3 \mu\text{g h}^{-1} \text{cm}^{-2}$; $K_p = 1.13 \times 10^{-3} \text{cm h}^{-1}$) (Table 5) and highest level of melatonin permeated from this sample ($119.20 \mu\text{g cm}^{-2}$). This is in accordance with previously argued ability of the formulations exhibiting low viscosity to augment J and K_p [43], although this generally holds true for viscosity changes of at least one order of magnitude, but it is well known that rheological differences of formulations should be considered as important ones for drug permeation profile.

On the other hand, considering the values of D , MMIX emulsion exhibited the lowest value after 24 h (Table 5), therefore, these differences in topical permeation could be explained by the higher value of the P_1 parameter, directly related to the membrane/donor phase partition coefficient (K) and the small value of the P_2 parameter, directly related to the diffusion coefficient.

These findings imply that drug permeated rate from emulsion systems is a complex parameter that cannot be correlated merely with the decrease in the viscosity. A study of penetration-enhancing effects of a number of lipophilic vehicles using differential scanning calorimetry and isolated stratum corneum sheets showed that MCTs did not alter phase transition temperatures and enthalpies of stratum corneum lipids, explaining the lack of MCTs penetration-enhancing effect in vivo [44]. It can be hypothesized, according to our results that the surfactant may interact differently depending on the composition of the vehicle and the surfactant arrangement within the formulation. Typical features of the lamellar liquid crystalline, particularly lamellar gel phase, such as planar layers, terraces and steps were observed in these kinds of emulsions and reported by other authors [45]. In accordance with Savić et al. [43] lamellar sheets are presumably made of mixed crystals bilayers, the greatest part of cetearyl glucoside being randomly distributed between the parts of cetearyl alcohol molecules. In addition, insertions of alkyl chains from three different filters, with potentially different mode of their packaging within the lamellae, are expected to have occurred. As PHE is non polar oil, and MCTs are distinguished by their polar groups, different types of forces are likely to be involved in their respective interactions with the surfactant and water, probably

affecting rheological behaviour and thermodynamic properties of melatonin contained within the systems.

Furthermore the greater flux obtained for MMIX emulsion could be due to the enhancement properties of the UV filters synergism. Probably due to the lipophilic character of the three UV filters, these could interact with lipid membrane facilitating the penetration of the melatonin. So the higher flux condition was favoured by the combination of three UV filters in MMIX emulsion.

Equally MMIX emulsion showed a penetration synergic index (SI) higher than the others formulations (Table 5), it can be hypothesized that drug thermodynamic activity in the emulsion is a significant driving force for its release and penetration into the skin, so that MMIX loading three UV filters should have the highest thermodynamic activity and consequently higher permeation rate.

Permeation profiles showed no statistically significant differences in the T_l values. These values ranged from 8.3 h for MLT emulsion to 13.6 h for MMIX emulsion, suggesting a poor absorption process, promoting the retention of the actives into the skin. In this way numerous investigators have demonstrated quantitative correlation between TEWL and percutaneous absorption due to the potential disruption in the stratum corneum. High values of T_l are in good accordance with the values of TEWL obtained after this permeation experiment which did not suggest damage of the human skin membranes. Modern sunscreens are selected on the basis of their retention in the stratum corneum and are formulated as poorly penetrating emulsions; they generally have very low to negligible penetration rates.

The amount of melatonin remaining in the skin after 24 h of MMIX emulsion treatment was $309.57 \mu\text{g g}^{-1} \text{cm}^{-2}$ (equivalent to the 30.95% of the initial dose placed in the donor compartment) a quantity markedly higher than from the rest of the assayed emulsions ($p < 0.05$), among which, no statistically differences was observed ranging from $124.83 \mu\text{g g}^{-1} \text{cm}^{-2}$ for MOMC to $144.80 \mu\text{g g}^{-1} \text{cm}^{-2}$ for MOS. Consequently, a sustained local action of melatonin could be expected.

MMIX seems to be the most appropriate formulation, since it provides the highest penetration flux and also reaches the highest value for drug retained in the skin.

Functions and phenotypic effects of melatonin and/or its metabolites are mediated by heterogeneous mechanisms including interactions with high-affinity receptors. The presence of specific and functionally active membrane (MT1 and MT2), cytosolic and nuclear (ROR α 1, ROR α 2, and RZR) melatonin receptors in mammalian skin and its appendages suggests the skin to be a major melatonin target [46]. Melatonin also has direct, receptor-independent properties, which include direct free radical scavenging properties or metabolic or enzymatic modulatory activities. Perhaps the most important of these activities relates to the containment of pathways protective of oxidative stress and the modification of cellular metabolism leading to strong protection against generation of ROS, depletion of antioxidants, damage of the type caused by ROS and inactivation of redox sensitive signal transduction pathways after irradiated skin. Melatonin also inhibits lipid peroxidation and nitric oxide formation, reduces

polyamine formation and stimulates antioxidative enzymes (such as glutathione-peroxidase, superoxide dismutase and catalase).

These side effects would be prevented by melatonin at concentrations from 10^{-3} to 10^{-6} M [47], which would be provided with a potential treatment with the MMIX emulsion according to our results. This strategy for enhancing the photoprotective effect of UV filters has been previously studied by using α tocopherol and other antioxidant agents, but no melatonin with the advantage that even lower doses are already sufficient. In fact, melatonin even has a higher reduction potential than vitamin C or trolox.

The cumulative amount at 24 h across the skin was $119.20 \mu\text{g cm}^{-2}$, meaning topical MMIX has a depot effect in the uppermost layer of the epidermis (stratum corneum).

Melatonin might protect skin integrity and might help to maintain a functional epidermal barrier through a variety of antioxidative activities, including antimutagenic, anticarcinogenic, oncstatic and chemopreventive potential effects against the damaging effects of UV or UV filters. [48].

3.5. Antioxidant activity

Antioxidant effects of melatonin can occur by at least two mechanisms. In one case, melatonin itself exerts direct antioxidant effects via free radical scavenging and/or by inhibiting their generation. Additionally, melatonin alters the activities of enzymes, which improve the endogenous antioxidant defence capacity of the organisms. Redox-sensitive transcription factors, such as nuclear factor NF κ B, by ROS is a central and early event in the induction of inflammatory reactions [49]. NF κ B is an oxidative stress sensitive factor that activates multiple target genes involved in the expression of several proinflammatory mediators. Melatonin has been reported to inhibit the NF κ B activation as action of the cell protection signalling of melatonin by transcriptional response control [50]. One approach to ameliorate adverse effects of UVB on the skin is the use of antioxidants scavenging and quenching ROS.

The direct antioxidant activity of melatonin, components of the formulations individually and the developed emulsions was evaluated. Table 6 shows mean values of the % DPPH reduction of samples after UV exposure and without exposure after preparation (0 days) and after a storage period of 12 months.

Figs. 3 and 4, show the antioxidant activity (as RSA%) behaviour of samples (UV exposure) both 0 days and 12 months. At 0 days, Fig. 3 shows clearly an intrinsic antioxidant capacity of sample 1 corresponding to melatonin (33.126%) when compared to the other actives substances and components individually, only OS, OMC and 3Bph filters (samples 2, 3 and 4 respectively) showed RSA individually (3.733%, 9.197% and 2.557% respectively) at the same concentration (1000 ppm) but it was very poor. The excipients of the formulation did not exhibit RSA or negligible. Thus it was considered that these components do not participate in the observed antioxidant properties of the rest of assayed samples (samples 9–17).

No statistically significant or relevant differences were found between light exposed and light protected assay in samples 1–8.

A significant decrease of the RSA of 45.40% was observed when compared free melatonin versus melatonin loaded emulsion MLT, it could be probably due to the oxidant activity of the emulsion vehicle (sample 8) as it is shown in Fig. 3. However only RSA decreases of 10.46%, 9.81% and no decrease occurred when compared free melatonin versus MOS formulation loading melatonin with octyl salicylate filter, MOMC formulation loading melatonin with octyl methoxycinnamate filter and M3Bph formulation loading melatonin with benzophenone-3 filter respectively ($p > 0.05$). The incorporation of the UV filters promotes the electron transference to reduce DPPH radical (samples 10, 11 and 12 versus sample 9). As shows Table 6, OS is the filter that better promotes the RSA (%) from 1.901 ± 0.335 to 29.667 ± 0.617 (sample 10). Contrary, the opposite phenomenon was observed in 3Bph (sample 12), from 64.529 ± 0.274 to 33.825 ± 0.690 (%), this different behaviour may be due to the circumstance that 3Bph is more unstable and would induce to a major production of ROS [10].

Table 6
Comparison of mean percent of reduction of DPPH radical scavenging activity (RSA% \pm SD) light protected and light exposed samples, after preparation and after a storage period of 12 months. Octyl salicylate (OS), octyl methoxycinnamate (OMC), benzophenone-3 (3Bph), perhydroesqualene (PHE), medium chain triglycerides (MCT) and Montanov[®] 68 (Mv).

Sample	Composition	0 days		12 months	
		Light protected	Light exposed	Light protected	Light exposed
1	Melatonin	34.0 \pm 1.6	33.1 \pm 0.1	16.5 \pm 0.3	18.7 \pm 0.4
2	OS	-0.3 \pm 0.6 ^a	3.7 \pm 0.5 ^b	-23.8 \pm 1.2 ^c	-21.2 \pm 0.5 ^d
3	OMC	10.7 \pm 0.4 ^a	9.2 \pm 0.4 ^b	-8.2 \pm 0.8 ^c	-7.1 \pm 0.3 ^d
4	3Bph	1.1 \pm 0.4 ^a	2.5 \pm 0.8 ^b	-33.8 \pm 1.3 ^c	-30.0 \pm 0.2 ^d
5	PHE	-1.3 \pm 0.2 ^a	-1.3 \pm 0.4 ^b	-21.7 \pm 1.2 ^c	-22.9 \pm 0.5 ^d
6	MCT	-1.2 \pm 0.2 ^a	1.2 \pm 0.3 ^b	-24.9 \pm 0.6 ^c	-25.4 \pm 0.6 ^d
7	Mv	-1.8 \pm 1.0 ^a	-4.9 \pm 0.6 ^b	-25.0 \pm 0.7 ^c	-26.8 \pm 0.5 ^d
8	Emulsion system (PHE + MCT + Mv)	-0.2 \pm 0.0 ^a	-8.9 \pm 0.6 ^b	-20.0 \pm 1.0 ^c	-20.5 \pm 0.4 ^d
9	MLT formulation (Melatonin + emulsion system)	-0.9 \pm 0.1 ^a	18.0 \pm 0.1 ^b	2.9 \pm 0.7 ^c	8.0 \pm 0.3 ^d
10	MOS formulation (Melatonin + OS + emulsion system)	1.9 \pm 0.3 ^a	29.6 \pm 0.6	3.7 \pm 0.8 ^c	27.3 \pm 0.2 ^d
11	MOMC formulation (Melatonin + OMC + emulsion system)	23.4 \pm 0.5 ^a	29.9 \pm 0.5	23.0 \pm 0.7 ^c	26.5 \pm 0.2 ^d
12	M3Bph formulation (Melatonin + 3Bph + emulsion system)	64.5 \pm 0.3 ^a	33.8 \pm 0.7	39.3 \pm 0.8 ^c	33.2 \pm 0.3 ^d
13	UV Filters emulsion (OS + OMC + 3Bph + emulsion system)	59.0 \pm 0.5 ^a	35.1 \pm 0.7	15.7 \pm 0.9	11.0 \pm 0.26 ^d
14	MMIX formulation (Melatonin + OS + OMC + 3Bph + emulsion system)	29.0 \pm 0.6	58.0 \pm 0.6 ^b	21.4 \pm 0.5	44.8 \pm 0.1 ^d
15	OS emulsion (OS + emulsion system)	-16.6 \pm 0.5 ^a	11.2 \pm 0.4 ^b	-25.3 \pm 0.4 ^c	-18.4 \pm 0.3 ^d
16	OMC emulsion (OMC + emulsion system)	-10.2 \pm 0.4 ^a	37.7 \pm 0.4	-3.4 \pm 0.3 ^c	20.5 \pm 0.3
17	3Bph emulsion (3Bph + emulsion system)	6.2 \pm 0.5 ^a	4.5 \pm 0.2 ^b	-19.0 \pm 0.3 ^c	-23.1 \pm 0.1

Statistically significant differences by ANOVA. DPPH radical scavenging activity versus melatonin 0 days: ^alight protected, ^blight exposed. After 12 months: ^clight protected, ^dlight exposed ($p < 0.05$).

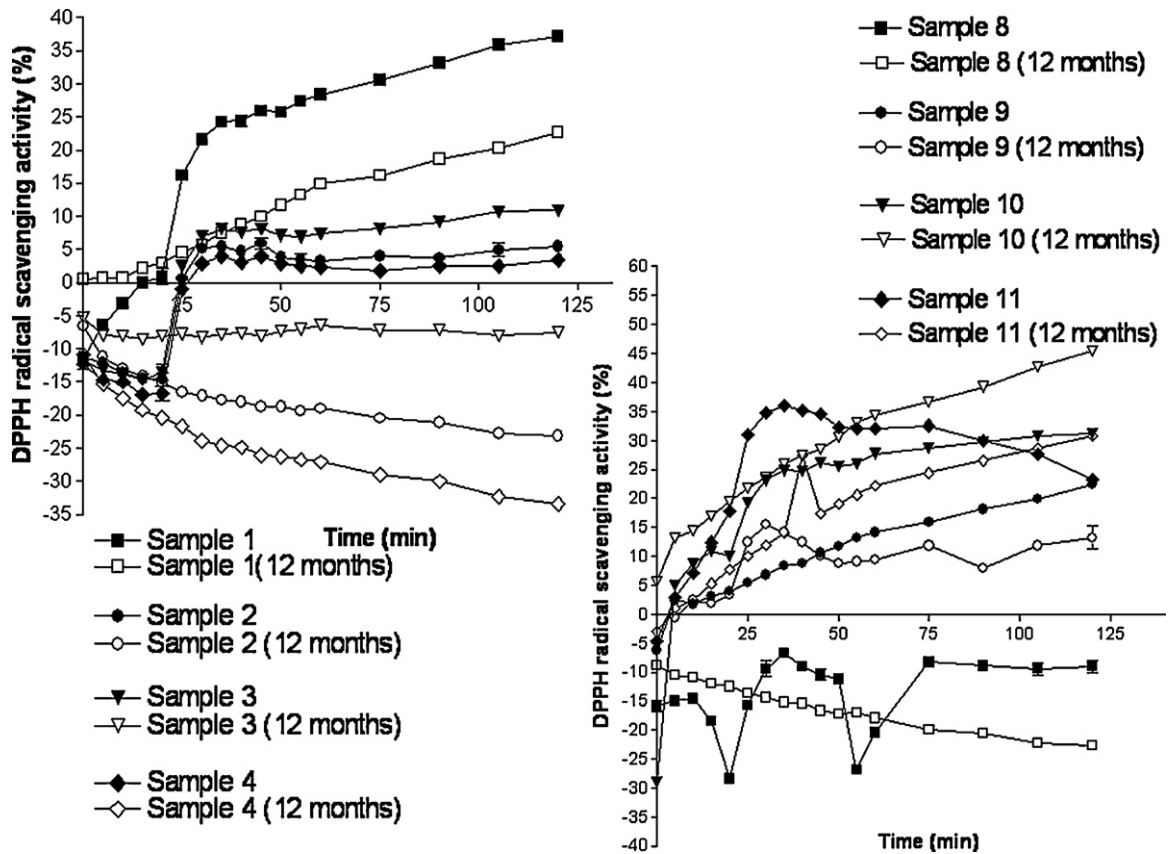


Fig. 3. Radical scavenging activity (%) curves of samples at day 0 and 12 months after storage period. (mean ± SD, n = 3).

Similarly sample 13 shows a RSA of 58.907 ± 0.475 (%) light protected and 35.130 ± 0.724 (%) light exposed, in this case the electron transference is due to a additive synergic mechanism [51].

In this way samples 15 (OS filter and emulsion vehicle), 16 (OMC filter and emulsion vehicle) and 17 (3Bph filter and emulsion) improve after incorporation of melatonin (samples 10, 11 and 12). This fact could lead to think that the addition of

melatonin to the sunscreen could be favourable for the antioxidant activity of the formulation, in fact when compared free melatonin sample versus sample 14 corresponding to MMIX formulation containing melatonin with the three UV filters a significant increase of 75.15% in the RSA was observed (Fig. 4). MMIX was the formulation that exhibited the highest rate of reduction of DPPH radical, this activity was also quantified as area under the curve

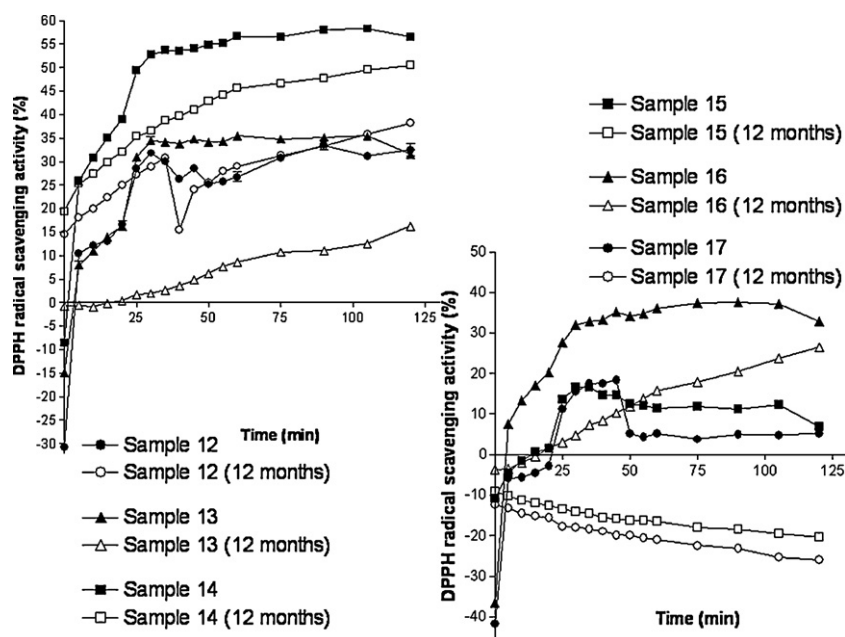


Fig. 4. Radical scavenging activity (%) curves of samples at day 0 and 12 months after storage period. (mean ± SD, n = 3).

(AUC) being 6094 (RSA min) versus 2967 (RSA min) of melatonin individually, 3229 (RSA min) of MOMC formulation, 3612 (RSA min) of sample 13 corresponding to the formulation with three UV filters without melatonin or 3789 (RSA min) of sample 16 corresponding to the formulation with OMC filter without melatonin.

Figs. 3 and 4 also show the evolution of the RSA of samples as a function of time. Sample 1 (free melatonin) showed a linear growing pattern after 30 min and reaching its maximum percentage of reduction at 120 min. Furthermore regarding samples corresponding to emulsions, all these showed a growing antioxidant pattern from the beginning to 25 min approximately. After this time point the behaviour of the emulsions was different, growing for MLT and MOS (samples 9 and 10), approximately constant for M3Bph and MMIX (samples 12 and 14), declining for MOMC (sample 11). Sample 13 containing only UV filters without melatonin showed a constant antioxidant activity from 25 to 120 min of 35% DPPH reduction. Thus it can be hypothesized that the first 25 min was OMC the responsible of this value of activity and then maintained by OS and 3Bph to 120 min, equally by the same line of reasoning might be the active melatonin which would increase the antioxidant activity value from 33.126% to 58.021% in MMIX emulsion.

Despite the excellent results it is unclear whether the described effects are the results of direct action of melatonin or products of their metabolism. Melatonin, is also synthesized and metabolized in the skin. This metabolism involves indolic and kynuric pathways [48]. Several authors have identified protective effects of UV-induced melatonin degradants, classified as antioxidative or antiinflammatory [52].

In order to clarify this controversy for the investigation of antioxidant activity, the effect of UV exposure on this metabolism was evaluated. Obviously, melatonin permeated through the skin showed not degradants products, due these studies were performed ex vivo. However, irradiation of melatonin formulations generated others compounds detected by HPLC.

In addition, skin expression of MT1, MT2, ROR and/or RZR is also modified by exposure to UVB. These effects suggest that UV might

act as modifiers of receptor activity or modifiers of cellular processing of the receptor [48]. These observations are particularly important, because some of the protective effects of MMIX formulation could be shared by its metabolites, such as N1-acetyl-N2-formyl-5-methoxykynuramine.

After 12 months the results of RSA (%) showed three main patterns of behaviour among the formulations. As can be observed from Figs. 3 and 4, a first group of samples in which the RSA did not decrease ($p > 0.05$), these were samples 10 and 12, corresponding to MOS formulation and M3Bph formulation respectively. A second group of samples in which the RSA exhibited a slight decrease, these were 9, 11 and 14, corresponding to MLT formulation, MOMC formulation and MMIX formulation respectively ($p < 0.05$). And finally, a third group in which RSA showed a severe decrease or loss, these were 13 (three UV filters formulation without melatonin), 15 (OS formulation without melatonin) 16 (OMC formulation without melatonin) and 17 (3Bph formulation without melatonin) ($p < 0.05$). In view of these results the vital role of melatonin is evident. Among the second group, the smallest decrease in RSA was for MMIX, in term of AUC this decrease was quantified as 17.8%. When compared the decrease in mean percent of reduction of DPPH between MMIX sample at day 0 and stored for 12 months it was observed that RSA of MMIX formulation after 12 months was still higher than other four formulations containing melatonin at 0 days. Thus these findings clearly demonstrated that MMIX was the most effective in possessing and maintaining a radical scavenging activity.

3.6. In vivo photoprotective effect

Firstly a test was conducted with these emulsions in order to evaluate the potential skin irritation effect when applied over a greater period of time.

After two days topically and nonocclusively application, no erythema formation was observed or visual changes in the hairless mice skin was observed when compared with hairless mice skin of untreated animals or those which had been treated in the same way with the unloaded emulsion vehicle. Furthermore, no

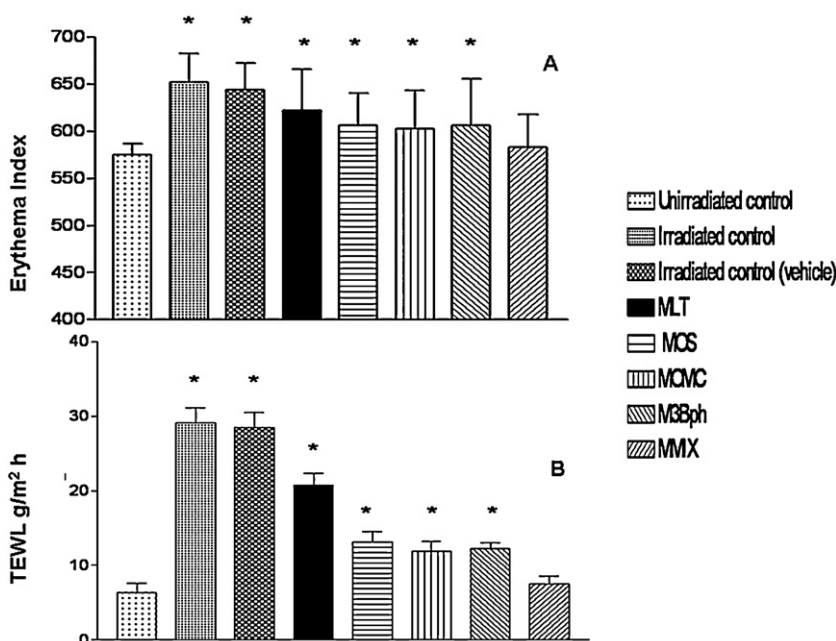


Fig. 5. (A) Erythema index obtained for the six treated groups (treated with MLT, MOS, MOMC, M3Bph, MMIX and emulsion vehicle without actives), and the control unirradiated group ($n = 3$ hairless mice). (B) Transepidermal water loss (TEWL) obtained for the six treated groups. Bars represents mean \pm SD. Bonferroni's multiple comparison t -test. * Significantly different from unirradiated control ($p < 0.005$).

statistical difference was observed in the skin redness measures among experimental animals.

After UV exposure, the results showed that the erythema and the TEWL values were significantly increased by UV radiation (Fig. 5A and B, respectively), when compared to the unirradiated control ($p < 0.05$), signifying that the equipment could detect damage to the skin and permeability barrier function. UV radiation induces abnormalities in the structures related to the epidermal permeability barrier function, these structures are responsible for corneocyte adhesion and maintenance of the functioning of the permeability barrier, which alters the TEWL measurements and accelerates the desquamation process [53].

MOS, MOMC, M3Bph and MMIX emulsions protected mouse skin against these damages, when compared with the irradiated control ($p < 0.05$) and with the irradiated unloaded emulsion vehicle treated area ($p < 0.05$). MLT formulation, containing melatonin without UV filters showed a statistically significant protective effect when compared with irradiated control and irradiated control vehicle (Fig. 5A) in accordance with studies performed, in which, a dose-dependent photoprotective effect from UV-induced erythema of melatonin was reported [54], but minor than the rest of assayed formulations containing UV filters.

Only MMIX treated and irradiated skin areas were statistically equivalent to the unirradiated control area. Because melatonin scavenges mostly hydroxyl radicals which are produced under the influence of UV light, studies with melatonin were performed especially in the field of photodermatology.

Equally it seems reasonable to hypothesize a stabilizing effect of melatonin against UV filters potential degradation reactions by preventing the reactive intermediates of photounstable filter substances behaving as photo-oxidants. In this way MMIX was the formulation with exhibited the best results in the photoprotective assay.

4. Conclusion

This study reports an approach on the use of the active melatonin in a sunscreen emulsion combined with common used UV filters octyl salicylate, octyl methoxycinnamate and benzophenone-3. The emulsion vehicle components were selected on the basis of their reported non irritant and hypoallergenic characteristics, hence Montanov[®] 68 as surfactant agent, MCTs and PHE as components of the oil phase. The obtained rheological behaviour of this emulsion vehicle was a desirable attribute for the developed formulations, because these would produce a coherent protective film over the skin surface. In vitro release studies revealed a two step release pattern (burst followed by a slower sustained release) with 80% release at 2 h. All formulations followed a first order mathematical model; however the Weibull equation also fitted the experimental data with good correlation. Permeation parameters through human skin showed the best results for MMIX formulation providing a lag time appropriate, the highest penetration flux and also reaching the highest value for melatonin retention in the skin, thus the topical application of this formulation would assure the skin protection provided by the beneficial effects of melatonin against oxidative stress and could attenuate radiation induced damage. Equally, the antioxidant activity assay has demonstrated that MMIX formulation possess the highest antioxidant properties over the rest of formulations, providing simultaneously a stabilizer effect in the formulation itself in addition of the biological effects of the melatonin. The in vivo assay demonstrated that irradiated skin areas of animals treated with MMIX were statistically equivalent to the unirradiated control areas, thus the photoprotective effect of the formulation was clearly shown.

Finally, it is concluded that the proposed MMIX emulsion containing melatonin combined with octyl salicylate, octyl

methoxycinnamate and benzophenone-3 for topical administration would be a promising formulation with good in vitro, ex vivo and in vivo pharmaceutical results for prevent the undesirable adverse effects of UV skin irradiation because melatonin not only acts as a potent antioxidant itself, but also is capable of activating an endogenous enzymatic protective system against oxidative stress.

Funding sources for this work

None.

Acknowledgement

The authors wish to acknowledge Dr. Humet from Hospital Barcelona-SCIAS (Barcelona, Spain) for providing skin samples.

References

- [1] Baier J, Maisch T, Landthaler M, Baumler W. Direct detection of singlet oxygen generated by UVA irradiation in human cells and skin. *J Invest Dermatol* 2007;127:1498–506.
- [2] Masaki H. Role of antioxidants in the skin: anti-aging effects. *J Dermatol Sci* 2010;58:85–90.
- [3] Shindo Y, Witt E, Han D, Packer L. Dose-response effects of acute ultraviolet irradiation on antioxidants and molecular markers of oxidation in murine epidermis and dermis. *J Invest Dermatol* 1994;102:470–5.
- [4] Bickers DR, Athar M. Oxidative stress in the pathogenesis of skin disease. *J Invest Dermatol* 2006;126:2565–75.
- [5] Stern RS, Weinstein MC, Baker SG. Risk reduction for nonmelanoma skin cancer with childhood sunscreen use. *Arch Dermatol* 1986;122:537–45.
- [6] Haywood R, Wardman P, Sanders R, Linge C. Sunscreens inadequately protect against ultraviolet A induced free radicals in skin: implication for skin aging and melanoma? *J Invest Dermatol* 2003;121:862–8.
- [7] Seidlova-Wuttke D, Christoffel J, Rimoldi G, Jarry H, Wuttke W. Comparison of effects of estradiol with those of octylmethoxycinnamate and 4-methylbenzylidene camphor on fat tissue, lipids and pituitary hormones. *Toxicol Appl Pharmacol* 2006;214:1–7.
- [8] Schlumpf M, Cotton B, Conscience M, Haller V, Steinmann B, Lichtensteiger W. In vitro and in vivo estrogenicity of UV screens. *Environ Health Perspect* 2001;109:239–44.
- [9] Heneweer M, Muusse M, Van den Berg M, Sanderson JT. Additive estrogenic effects of mixtures of frequently used UV filters on pS2-gene transcription in MCF-7 cells. *Toxicol Appl Pharmacol* 2005;15:170–7.
- [10] Hanson KM, Gratton E, Bardeen CJ. Sunscreen enhancement of UV-induced reactive oxygen species in the skin. *Free Radic Biol Med* 2006;41:1205–12.
- [11] Damiani E, Baschong W, Greci L. UV-Filter combinations under UVA exposure: concomitant quantification of over-all spectral stability and molecular integrity. *J Photochem Photobiol* 2007;87:95–104.
- [12] Bonda CA. The photostability of organic sunscreen actives: a review. *Cosmet Sci Technol Ser* 2005;28:321–49.
- [13] Tournas JA, Ubiquinone, idebenone, and kinetin provide ineffective photoprotection to skin when compared to a topical antioxidant combination of vitamin C and E with ferulic acid. *J Invest Dermatol* 2006;126:1185–7.
- [14] Tan DX, Chen LD, Poeggeler B, Manchester LC, Reiter RJ. Melatonin: a potent, endogenous hydroxyl radical scavenger. *Endocrine J* 1993;1:57–60.
- [15] Galano A, Tan DX, Reiter RJ. Melatonin as a natural ally against oxidative stress: a physicochemical examination. *J Pineal Res* 2011;51:1–16.
- [16] Vijayalaxmi, Reiter RJ, Tan DX, Herman TS, Thomas Jr CR. Melatonin as a radioprotective agent: a review. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2004;3:639–53.
- [17] Kim BC, Shon BS, Ryoo YW, Kim SP, Lee KS. Melatonin reduces X-ray irradiation-induced oxidative damages in cultured human skin fibroblasts. *J Dermatol Sci* 2001;26:194–200.
- [18] Gitto E, Pellegrino S, Gitto P, Barberi I, Reiter RJ. Oxidative stress of the newborn in the pre- and postnatal period and the clinical utility of melatonin. *J Pineal Res* 2009;46:128–39.
- [19] Saija A, Tomaino A, Trombetta D, Pellegrino ML, Tita B, Caruso S, et al. Interaction of melatonin with model membranes and possible implications in its photoprotective activity. *Eur J Pharm Biopharm* 2002;53:209–15.
- [20] Kleszczyński K, Lena HH, Fischer TW. Differential effects of melatonin as a broad range UV-damage preventive dermato-endocrine regulator. *Dermato-Endocrinology* 2011;3:27–31.
- [21] Slominski A, Pisarchik A, Semak I, Sweatman T, Wortsman J, Szczesniowski A, et al. Serotonergic and melatonergic systems are fully expressed in human skin. *FASEB J* 2002;16:896–8.
- [22] Slominski A, Wortsman J, Tobin DJ. The cutaneous serotonergic/melatonergic system: securing a place under the sun. *FASEB J* 2005;19:176–94.
- [23] Slominski AT, Zmijewski MA, Skobowiat C, Zbytek B, Slominski RM, Steketee JD. Sensing the environment: regulation of local and global homeostasis by the skin's neuroendocrine system. *Adv Anat Embryol Cell Biol* 2012;212:1–115.

- [24] Savić S, Vuleta G, Daniels R, Müller-Goymann CC. Colloidal microstructure of binary systems and model creams stabilized with an alkylpolyglucoside non-ionic emulsifier. *Colloid Polym Sci* 2005;283:439–51.
- [25] Holdsworth SD. Rheological models used for prediction of the flow properties of food products: a literature review. *Trans Inst Chem Eng* 1993;71:139–79.
- [26] Costa P, Sousa JM. Modeling and comparison of dissolution profiles. *Eur J Pharm Sci* 2001;13:123–33.
- [27] Yamaoka K, Nakagawa T, Uno T. Application of Akaike's information criterion (AIC) in the evaluation of linear pharmacokinetic equations. *J Pharmacokinet Biopharm* 1978;6:165–75.
- [28] Council Regulation (EC) No 440/2008. Test guideline for skin absorption: in vitro method (B.45). *Off J Eur Union* 2008;L142:438–43.
- [29] Netzlaff F, Kostka KH, Lehr CM, Schaefer UF. TEWL measurements as a routine method for evaluating the integrity of epidermis sheets in static Franz type diffusion cells in vitro. Limitations shown by transport data testing. *Eur J Pharm Biopharm* 2006;63:44–50.
- [30] Van der Valk PGM, Kucharekova M, Tupker RA. Transepidermal water loss and its relation to barrier function and skin irritation. In: Fluhr J, Elsner P, Berardesca E, Maibach HI, editors. *In the bioengineering of the skin, water and the stratum corneum*. Boca Raton: CRC Press; 2005. p. 97–104.
- [31] Fernández-Campos F, Calpena-Campmany AC, Rodríguez-Delgado G, López-Serrano O, Clares-Naveros B. Development and characterization of a novel nystatin-loaded nanoemulsion for the buccal treatment of candidosis: ultra-structural effects and release studies. *J Pharm Sci* 2012. <http://dx.doi.org/10.1002/jps.23249>.
- [32] Brand-Williams W, Cuvelier ME, Bertsch C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *Lebensm Wiss Technol* 1995;28:25–30.
- [33] Devos SA, Van der Endt JD, Broeckx W, Vandaele M, Del Marmol V, Roseeuw D, et al. Sunscreen use and skin protection behaviour on the Belgian beach: a comparison 9 years later. *Eur J Cancer Prev* 2012. <http://dx.doi.org/10.1097/CEJ.0b013e328350b084>.
- [34] Zimmermann M. Ethical guidelines for investigations of experimental pain in conscious animals. *Pain* 1983;16:109–10.
- [35] Maia-Campos PM, Gianetti MD, Kanashiro A, Lucisano-Valim YM, Gaspar LR. In vitro antioxidant and in vivo photoprotective effects of an association of bioflavonoids with liposoluble vitamins. *Photochem Photobiol* 2006;82:683–8.
- [36] Lodén M. Role of topical emollients and moisturizers in the treatment of dry skin barrier disorders. *Am J Clin Dermatol* 2003;4:771–8.
- [37] Hewitt J, Dahms GH. Rheology. Its effect on physical SPFs. *Soap Perfum Cosmet* 1996;69:23–5.
- [38] Pader M. Dentifrice rheology. In: Laba D, editor. *In the rheological properties of cosmetic and toiletries*. New York: Marcel Dekker; 1993. p. 247–73.
- [39] Gaspar LR, Maia-Campos PM. Rheological behavior and the SPF of sunscreens. *Int J Pharm* 2003;250:35–44.
- [40] Nikovska K. Oxidative stability and rheological properties of oil in water emulsions with walnut oil. *Adv J Sci Technol* 2010;2:172–7.
- [41] Papadopoulou V, Kosmidis K, Vlachou M, Macheras P. On the use of the Weibull function for the discernment of drug release mechanisms. *Int J Pharm* 2006;309:44–50.
- [42] Fang JY, Hwang TL, Fang CL, Chiu HC. In vitro and in vivo evaluations of the efficacy and safety of skin permeation enhancers using flurbiprofen as a model drug. *Int J Pharm* 2003;255:153–66.
- [43] Savić S, Savić M, Tamburić S, Vuleta G, Vesić S, Müller-Goymann CC. An alkylpolyglucoside surfactant as a prospective pharmaceutical excipient for topical formulations: the influence of oil polarity on the colloidal structure and hydrocortisone in vitro/in vivo permeation. *Eur J Pharm Sci* 2007;30:441–50.
- [44] Leopold CS, Lippold BC. Enhancing effects of lipophilic vehicles on skin penetration of methyl nicotinate in vivo. *J Pharm Sci* 1995;84:195–8.
- [45] Makai M, Csányi E, Németh Z, Pálkás J, Erős I. Structure and drug release of lamellar liquid crystals containing glycerol. *Int J Pharm* 2003;256:95–107.
- [46] Slominski RM, Reiter RJ, Schlabritz-Loutsevitch N, Ostrom RS, Slominski AT. Melatonin membrane receptors in peripheral tissues: distribution and functions. *Mol Cell Endocrinol* 2012;351:152–66.
- [47] Fischer TW, Zmijewski MA, Wortsman J, Slominski A. Melatonin maintains mitochondrial membrane potential and attenuates activation of initiator (casp-9) and effector caspases (casp-3/casp-7) and PARP in UVR-exposed HaCaT keratinocytes. *J Pineal Res* 2008;44:397–407.
- [48] Slominski A, Tobin DJ, Szczesniowski MA, Wortsman J, Paus R. Melatonin in the skin: synthesis, metabolism and functions. *Trends Endo Metab* 2008;19:17–24.
- [49] Fuchs J, Zollner TM, Kaufmann R, Podda M. Redox-modulated pathways in inflammatory skin diseases. *Free Radic Biol Med* 2001;30:337–53.
- [50] Sainz RM, Reiter RJ, Tan DX, Roldan F, Natarajan M, Quiros I, et al. Critical role of glutathione in melatonin enhancement of tumor necrosis factor and ionizing radiation-induced apoptosis in prostate cancer cells in vitro. *J Pineal Res* 2008;45:258–70.
- [51] Tallarida RJ. Drug synergism: its detection and applications. *J Pharmacol Exp Ther* 2001;298:865–72.
- [52] Fischer TW, Sweatman TW, Semak I, Sayre RM, Wortsman J, Slominski A. Constitutive and UV-induced metabolism of melatonin in keratinocytes and cell-free systems. *FASEB J* 2006;20:1564–6.
- [53] Meguro S, Arai Y, Masukawa K, Uie K, Tokimitsu I. Stratum comeum lipid abnormalities in UVB-irradiated skin. *Photochem Photobiol* 1999;69:317–21.
- [54] Dreher F, Gabard B, Schwindt DA, Maibach HI. Topical melatonin in combination with vitamins E and C protects skin from ultraviolet-induced erythema: a human study in vivo. *Br J Dermatol* 1998;139:332–9.

Artículo 3

**CIRCADIAN RHYTHMS ON SKIN FUNCTION OF HAIRLESS RAT:
LIGHT AND THERMIC INFLUENCES**

*(Ritmos circadianos en la funcionalidad de la piel en rata Hairless:
Influencia de la luz y de la temperatura)*

Ana Flo, Antoni Díez-Noguera, Ana C. Calpena, Trinitat Cambras

Experimental Dermatology 2014; 23; 214-216

Índice de impacto: 3.762 (ISI Journal Citation Reports)

Categoría: Dermatología: 7/63 (Q1)

Los resultados de este estudio han sido presentados en formato de comunicación oral en la siguiente jornada:

- *Influeixen els ritmes funcionals de la pell en l'aplicació de productes dermatològics o cosmètics?* Flo, A.; Díez-Noguera, T.; Calpena, A.C.; Cambras, T. VI Jornada de Recerca a la Facultat de Farmàcia. Barcelona, España, Abril 2013.

Resumen

Objetivo: El objetivo de este estudio fue investigar la presencia y características de los ritmos circadianos en la funcionalidad de la piel de las ratas *Hairless*, debido al interés de este modelo animal en dermatología experimental.

Métodos: Se midió el TEWL, la SCH y Ts cada dos horas durante 24 horas. Por otra parte, se registró la actividad motora cada 15 minutos durante todo el experimento. El estudio se llevó a cabo con ratas adaptadas a los ciclos de LD, bajo DD y bajo LL, situación que indujo la arritmicidad en la rata. Bajo LD y LL se investigó el efecto de las variaciones en la temperatura ambiental sobre la funcionalidad de la piel.

Resultados: Ambos SCH y TEWL mostraron ritmos circadianos muy claros bajo LD y DD, aunque, la amplitud del ritmo de TEWL fue aumentando a lo largo del experimento. TEWL dependía de la temperatura de la piel y ambas variables fueron fuertemente afectadas por la temperatura exterior. Por otra parte los valores TEWL y SCH aumentaron con la edad del animal. Bajo LL, las variables TEWL y temperatura cutánea se mostraron directamente correlacionadas con la temperatura ambiente, mientras que SCH se correlacionó inversamente.

Conclusión: Estos resultados evidencian la presencia de los ritmos circadianos en las variables de la piel bajo condiciones de LD y DD, lo que sugiere la dependencia de las funciones de la piel del *pacemaker* central y la importancia de los ritmos de la piel en la investigación farmacológica en ciencias dermatológicas.

reports showing that HDACIs can diminish the inflammatory effects of EGFRs (9) suggest that combined treatment may benefit certain inflammatory hyperproliferative skin diseases. Studies of chemicals reported to inhibit both histone deacetylases and EGFR signalling (12) are of similar interest.

Acknowledgements

This research was supported in part by the NIH grant R01 ES017014. We acknowledge the helpful advice from Dr. Judith A. Cole as well as the technical assistance from Dr. Clarisse Muenyi and Ms. Gayatri Mamidanna.

References

- Pastore S, Mascia F, Mariani V *et al.* *J Invest Dermatol* 2008; **128**: 1365–1374.
- Tran Q T, Kennedy L H, Leon Carrion S *et al.* *Physiol Genomics* 2012; **44**: 455–469.
- Proksch E, Brandner J M, Jensen J-M. *Exp Dermatol* 2008; **17**: 1063–1072.
- King L E Jr, Gates R E, Stoscheck C M *et al.* *J Invest Dermatol* 1990; **95**: 10S–12S.
- Peus D, Hamacher L, Pittelkow M R. *J Invest Dermatol* 1997; **109**: 751–756.
- Staiano-Coico L, Helm R E, McMahon C K *et al.* *Cell Tissue Kinet* 1989; **22**: 361–375.
- Saunders N, Dicker A, Popa C *et al.* *Cancer Res* 1999; **59**: 399–404.
- Sutter C H, Yin H, Li Y *et al.* *Proc Natl Acad Sci* 2009; **106**: 4266–4271.
- Chung Y L, Pui N N. *J Dermatol Sci* 2011; **64**: 163–173.
- Shi Y L, Gu J, Park J Y *et al.* *J Dermatol Sci* 2012; **68**: 99–107.
- Daehn I S, Varelias A, Rayner T E. *Apoptosis* 2006; **11**: 1379–1390.
- Wang J, Pursell N W, Samson M E S *et al.* *Mol Cancer Ther* 2013; **12**: 925–936.

Author contributions

Sandra Leon Carrion (SLC), Carrie H. Sutter (CHS) and Thomas R. Sutter (TRS) designed research. SLC performed research. SLC, CHS and TRS analysed and interpreted the data. SLC and TRS wrote the manuscript; CHS revised the manuscript.

Conflict of interest

The authors have declared no conflicting interests.

DOI: 10.1111/exd.12338
www.wileyonlinelibrary.com/journal/EXD

Letter to the Editor

Circadian rhythms on skin function of hairless rats: light and thermic influences

Ana Flo^{1,2}, Antoni Díez-Noguera¹, Ana C. Calpena² and Trinitat Cambras¹

¹Departament de Fisiologia, Facultat de Farmàcia, Universitat de Barcelona, Barcelona, Spain; ²Departament de Farmàcia i Tecnologia Farmacèutica, Facultat de Farmàcia, Universitat de Barcelona, Barcelona, Spain

Correspondence: Trinitat Cambras, Departament de Fisiologia, Facultat de Farmàcia, Universitat de Barcelona, Av. Joan XXIII s/n, Barcelona 08028, Spain, Tel.: (34)-934024505, Fax: (34)-934035901, e-mail: cambras@ub.edu

Abstract: Circadian rhythms are present in most functions of living beings. We have demonstrated the presence of circadian rhythms in skin variables (transepidermal water loss, TEWL; stratum corneum hydration, SCH; and skin temperature) in hairless rats under different environmental conditions of light and temperature. Circadian rhythms in TEWL and SCH showed mean amplitudes of about 20% and 14% around the mean, respectively, and appeared under light–dark cycles as well as under constant darkness. Environmental temperature was able to override TEWL, but not SCH rhythm, evidencing the dependency of TEWL on the

temperature. Mean daily values of TEWL and SCH, and also the amplitude of TEWL rhythm, increased with the age of the animal. Under constant light, situation that induces arrhythmicity in rats, SCH and TEWL were inversely correlated. The results suggest the importance to take into account the functional skin rhythms in research in dermatological sciences.

Key words: circadian rhythms – hairless rat – skin – stratum corneum hydration – TEWL

Accepted for publication 1 February 2014

Background

Most organisms show daily rhythms in their physiology and behaviour, which have evolved from adaptation to the external changing world. In mammals, the circadian system is composed by a central pacemaker in the suprachiasmatic nuclei of the hypothalamus (1) and subsidiary clocks in many other tissues (2,3). Skin is an organ exposed directly to light that shows circadian rhythms in some processes, such as epidermal cell proliferation (4,5). Also, clock genes and proteins have been identified in their

cells (6,7). The barrier properties of the skin reside primarily in the stratum corneum. The determination of the stratum corneum hydration (SCH) allows evaluating the condition of the skin. Moreover, skin provides protection against water loss to maintain the water volume of the organism (8). This function is achieved by the lipid barrier of the stratum corneum, which is also of importance for topical drug permeability. A good indicator for the barrier functionality is the measure of the transepidermal water loss (TEWL) (9). TEWL is affected by internal factors, such as

body temperature, activity and metabolism, but also by external factors such as the environment humidity or temperature, which can mask the values and their interpretation.

Questions addressed

The aim of this work was to evaluate the circadian rhythm of the skin functions in an animal model such as hairless rats and determine their dependency on the environmental light and temperature. Also, we tested whether the skin variables could be dependent on the rhythmic pattern of the animal.

Experimental design

We measured skin temperature, TEWL, SCH and motor activity levels of eight male hairless rats in six experimental days under different lighting conditions (Figure S1). In each experimental day, measures were obtained every 2 h for 24 consecutive hours under different environmental conditions (Figure S2). All data values were referred to the time of the subjective day (circadian time, CT). Thus, CT0 and CT12 corresponded, respectively, to the onset of the subjective day (rest) and subjective night (activity). To investigate the presence of circadian rhythms, data from each experimental day and variable were fitted to a sinusoidal function (10), providing the estimation of the amplitude of oscillation, expressed

as a percentage of variation around the mean, and its acrophase (the time the adjusted curve reaches its highest value). Moreover, differences between the subjective day and night were calculated. Under constant light (LL), the circadian rhythms were lost and linear correlation between environmental temperature and skin variables was analysed. Methodology is described in Data S1.

Results

In all cases, nocturnal values were higher than diurnal (Fig. 1), excepting under L_tD , where skin temperature and TEWL were higher during light, following the environmental temperature. Both SCH and TEWL increased the mean daily values throughout the days of the experiment when animals were rhythmic (linear regression, $r^2 = 0.8989$ $n = 6$, $P < 0.01$ and $r^2 = 0.9179$ $n = 6$, $P < 0.01$, respectively). Circadian rhythm for skin temperature resulted statistically significant in all tests ($P < 0.05$), with the acrophase during the second half of the subjective night (Fig. 2) excepting in L_tD , when the increase in the environmental temperature caused a displacement of the acrophase towards the light phase. TEWL circadian rhythms were significant ($P < 0.05$) only from DD_2 onwards, and their acrophases paralleled the skin temperature rhythm. SCH data fitted to a 24-h rhythm ($P < 0.05$) in all cases excepting under L_tD ($P = 0.059$) and its acrophase was always found in the second half of the subjective night. Under LL, SCH showed the highest value (Fig. 2) and it was inversely correlated with temperature and TEWL (Figure S2).

Discussion

We have described the circadian rhythmicity of non-anesthetized hairless rats (to avoid temperature decrease due to anaesthesia) in behaviour and skin functions. The mean amplitudes for SCH and TEWL reached values close to 20%, indicating that daily variations could be important for results interpretation in experiments in dermatological sciences.

Circadian rhythms in the skin variables are manifested under LD or DD conditions, showing their dependency on the animal rhythmic pattern, but the independency on the light. In the case of TEWL, in the first two tests, circadian rhythms were not found, reflecting a possible evolution of this variable along the age of the

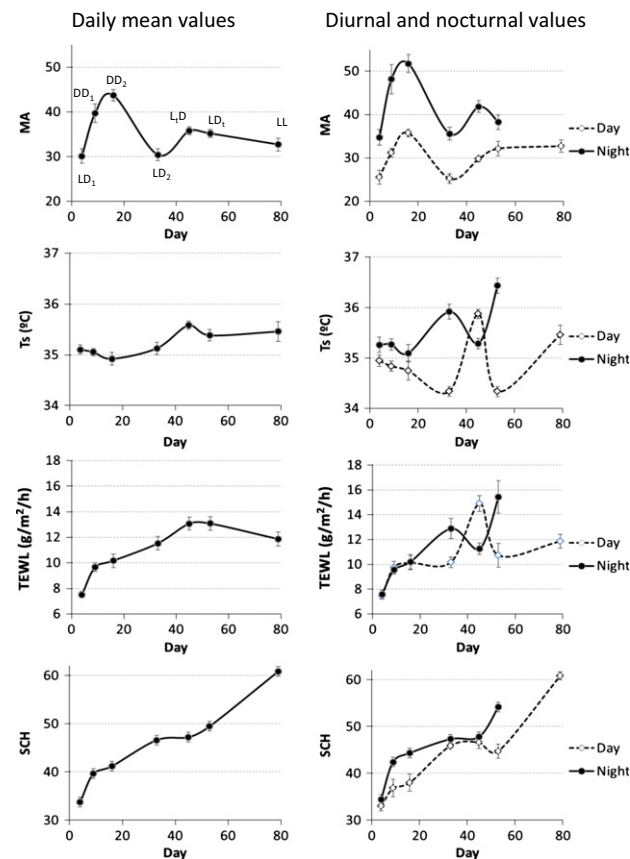


Figure 1. Evolution through time of the mean daily values (left) and the mean of nocturnal and diurnal values (right) of the different variables studied (MA = motor activity, Ts = skin temperature). X axis indicates the days that the experiment lasted, and the points correspond to the experimental days. Environmental conditions are indicated as follows: LD_1 and LD_2 were cycles of 12-h light/12-h darkness; DD_1 and DD_2 constant dim red light (0.5 lux); L_tD : 12:12 light/dark cycles with high temperature during light phase; LD_t : 12:12 light/dark cycles with high temperature during darkness; LL: constant bright light (350 lux).

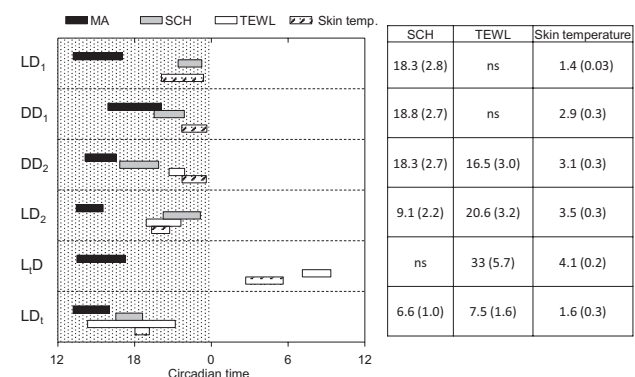


Figure 2. Map of phases of the rhythms of the different variables on the six first experimental days, when rats showed circadian motor activity rhythms. X axis indicates the time of the subjective day of the animal. Dotted area, from CT12 to CT0, corresponds to the subjective night of the rat (activity phase). Each horizontal bar represents the 95% confidence interval of the estimated acrophase, which indicates the time of day when the values of the variable are higher. On the right, the mean amplitude and standard error, in brackets, of the rhythms are indicated; ns = non-statistically significant rhythm.

individuals (11). TEWL has been found to be dependent on the skin surface temperature (12), and both rhythms are modified according to the environmental temperature. The circadian variations in these variables could be due to the rhythm of core body temperature and also to modifications in the degree of dilatation of subcutaneous vascular network. This agrees with the fact that the basal TEWL, in humans, reaches their highest levels around 3:00 h (13), corresponding to the peak in skin surface temperature. TEWL is useful to determine the state of the skin water barrier (14) and it correlates with percutaneous absorption (15). Thus, the knowledge of its circadian rhythm may be useful to deduce the moment of the day at which the barrier is less disrupted and determine the best time of day for testing topical drug delivery. Contrary to TEWL, SCH is a constituent property of the skin structure and thus is not easily modified by external factors such as temperature.

Our results also indicate that skin variables depend on the integrity of the circadian pacemaker, because when animal became arrhythmic by exposure to constant light, TEWL and SCH were differently correlated with temperature, suggesting different regulations of both variables.

References

- Dibner C, Schibler U, Albrecht U. *Annu Rev Physiol* 2010; **72**: 517–549.
- Richards J, Gumz M L. *FASEB J* 2012; **26**: 3602–3613.
- Hastings M H, Reddy A B, Maywood E S. *Nat Rev Neurosci* 2003; **4**: 649–661.
- Geyfman M, Andersen B. *J Invest Dermatol* 2009; **129**: 1063–1066.
- Geyfman M, Andersen B. *Aging (Albany NY)* 2010; **2**: 122–128.
- Zanello S B, Jackson D M, Holick M F. *J Invest Dermatol* 2000; **115**: 757–760.
- Tanioka M, Yamada H, Doi M *et al.* *J Invest Dermatol* 2009; **129**: 1225–1231.
- Menon G K K A. *Skin Pharmacol Physiol* 2009; **22**: 178–189.
- Machado M, Hadgraft J, Lane M E. *Int J Cosmet Sci* 2010; **32**: 397–409.
- Batschelet E. *Circular Statistics in Biology*. London, New York: Academic Press, 1981.
- Fluhr J W, Darlenski R, Taieb A *et al.* *Exp Dermatol* 2010; **19**: 483–492.
- Mathias C G, Wilson D M, Maibach H I. *J Invest Dermatol* 1981; **77**: 219–220.
- Denda M, Tsuchiya T. *British J Dermatol* 2000; **142**: 881–884.
- Fluhr J W, Feingold K R, Elias P M. *Exp Dermatol* 2006; **15**: 483–492.
- Levin J, Maibach H. *J Control Release* 2005; **103**: 291–299.
- Man M Q, Xin S J, Song S P *et al.* *Skin Pharmacol Physiol* 2009; **22**: 190–199.
- Darlenski R, Kazandjieva J, Tsankov N *et al.* *Exp Dermatol* 2013; **22**: 752–753.
- Gupta M A, Gupta A K. *Clin Dermatol* 2013; **31**: 118–126.

Acknowledgements

This work was supported by the Ministerio de Educación y ciencia (BFU2008-00199). The authors thank Dr. A.del Pozo for lending the measuring apparatus. All authors designed the experiment and performed the research. AF, ADN and TC analysed the data and wrote the manuscript.

Conflict of interests

The authors state no conflict of interests.

Supporting Information

Additional Supporting Information may be found in the online version of this article:

Data S1. Detailed methods and materials.

Figure S1. Actogram of a representative animal along the experimental conditions.

Figure S2. Daily profiles of the variables in the experimental days.

Figure S3. Results under constant light.

DOI: 10.1111/exd.12339

www.wileyonlinelibrary.com/journal/EXD

Letter to the Editor

Insulin-like growth factor-1: roles in androgenetic alopecia

Ratchathorn Panchaprateep and Pravit Asawanonda

Division of Dermatology, Department of Medicine, Faculty of Medicine, Chulalongkorn University, Bangkok, Thailand

Correspondence: Ratchathorn Panchaprateep, MD, Division of Dermatology, Department of Medicine, Faculty of Medicine, Chulalongkorn University, Bangkok, 10330, Thailand. Tel.: +66898923819, Fax: +662564253 #102, e-mails: rpanchaprteep@gmail.com

Abstract: Of all the cytokines or growth factors that have been postulated to play a role in hair follicle, insulin-like growth factor-1 (IGF-1) is known to be regulated by androgens. However, how IGF-1 is altered in the balding scalp has not yet been investigated. In this study, expressions of IGF-1 and its binding proteins by dermal papilla (DP) cells obtained from balding versus non-balding hair follicles were quantified using growth factor array. DP cells from balding scalp follicles were found to secrete

significantly less IGF-1, IGFBP-2 and IGFBP-4 ($P < 0.05$) than their non-balding counterparts. Our data confirmed that the downregulation of IGF-1 may be one of the important mechanisms contributing to male pattern baldness.

Key words: androgenetic alopecia – hair follicle – IGF-1

Accepted for publication 31 January 2014

CIRCADIAN RHYTHMS ON SKIN FUNCTION OF HAIRLESS RATS: LIGHT AND THERMIC INFLUENCES

Ana Flo^{1,2}, Antoni Díez-Noguera¹, Ana C. Calpena², Trinitat Cambras^{1,*}

¹ Departament de Fisiologia. ² Departament de Farmàcia i Tecnologia Farmacèutica. Facultat de Farmàcia. Universitat de Barcelona. Barcelona, Spain

SUPPORTING INFORMATION

Data S1: Detailed methods and materials

Animals and housing.

Eight male hairless Sprague-Dawley rats (Janvier, France) were used for the experiments. They were housed in the institution's animal facilities, were individually kept in transparent methacrylate cages and maintained in sound-proof chambers with temperature regulated. Animals had access to food and tap water ad libitum. Cages were supplied with wood chippings for bedding, which were weekly renewed. Luminance, measured at cage level, was 350 lux during the light-period and 0.5 lux of red light during the dark-period. The experimental protocols were approved by the Institutional Animal Care and Use Committee of the University of Barcelona.

Experimental design.

Rats arrived at the lab at the age of 6 weeks and were adapted to the experimental condition of 12:12-h light-dark cycles (LD) for 4 days. Afterwards rats were transferred to constant darkness (DD) for 2 weeks. Then, rats were returned to LD for 30 days to resume synchronization. During these conditions the environmental temperature was maintained at 22.4°C (standard error = 1°C). Afterwards, on day 45 environmental temperature was increased until 28°C during light phase and remained at 22°C during darkness (L_tD). One week later, on day 53, environmental temperature was increased to 28°C during darkness and decreased during

light until 22°C (LD_t). Finally rats were transferred to constant light (LL) in order to induce arrhythmicity to the animals and to test the effect of environmental temperature on the animals in absence of a manifested circadian rhythm. To do so, once the animals were arrhythmic, environmental temperature was slowly increased until 28°C in order to allow adaptation and afterwards environmental temperature was allowed to decrease progressively until 22°C in 22 hours to see the direct effect of temperature over the skin variables.

Motor activity was measured throughout all the experiment by means of activity-meters with 2 perpendicular infrared beams, which crossed the cage 7 cm above the floor. Motor activity counts were sampled every 15 minutes and stored on a computer system for further analysis.

The measure of the skin variables was done with a Cutometer® MPA 580 (Courage and Khazaka, Electronic GmbH, Cologne, Germany), using specific probes for each variable.

Skin temperature was measured using an infrared detector "Skin Thermometer ST500". For each measure ten consecutive readings were averaged.

TEWL was measured with a Tewameter® TM 300. To stabilize the probe, it was kept on the skin surface for 1 minute, after which 10 readings were determined and the average was obtained. Values were expressed as $\text{g}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{h}^{-1}$.

SCH was measured by a capacitance method (based on the dielectric constant of water) using a Corneometer® 825. Each measure was expressed in arbitrary units (AU), after averaging 10 readings.

The measurement of the skin variables took place at certain days of the experiment under different environmental conditions, which correspond to the experimental days: day 4 under LD (test 1: LD₁); days 9 and 16 under DD (test 2: DD₁ and test 3: DD₂, respectively); day 33 (test 4: LD₂); day 45 (test 5: L_tD); day 53 (test 6: LD_t) and finally when the rats were totally arrhythmic, on day 79 (test 7: LL). On these days, skin temperature, TEWL and SCH were measured every 2 hours consecutively for 24 hours. Thus, every 2 hours the animal was taken out of the cages, covered with a cloth to reduce anxiety and gently subjected by the researcher, who measured, always in the same order, the three variables on the lower back skin.

Data analysis.

In order to compare the results according to the rhythm of the rat, data values were time referenced as ZT hours (Zeitgeber time), when animals were under LD, so the time at which the light was turned off was considered ZT12. When animals were under DD, CT12 (circadian time 12) corresponded to the onset of the subjective night, this is the beginning of the activity phase in a nocturnal animal such as the rat. In a similar way, ZT0 or CT0 corresponded to the onset of the rest phase under 24 hour light-dark cycles or constant lighting conditions respectively.

For each animal and each experimental day, the mean data values of each variable were obtained. Moreover, differences between day and night were also calculated by considering mean values between ZT0 to ZT11 (or CT0 to CT11) as “diurnal” values and those between ZT12 to ZT23 (or CT12 to CT23) as “nocturnal” values. To match motor activity data with skin measurements, the mean profile of motor activity for the 5 days previous to each test was obtained in 2 hour bouts of activity and the same reference time was applied.

In the case of the LL test, due to the lack of internal time references caused by the loss of the circadian rhythms, the time when measures were carried out were referenced with respect to the time of the first measure on this day: measures from 1 to 12 carried out every 2 hours.

To analyze circadian rhythmicity for each experimental day the individual data of each animal were normalized. To do so, the data of each ZT or CT were expressed as their variation around the daily mean value. To investigate the presence of circadian rhythms, data from all individuals for each test were fit to a sinusoidal function by a least squares periodic regression. In this way the characteristic parameters of the rhythm were obtained: the amplitude of oscillation, expressed as a percentage of variation around the mean, and its acrophase (the time the adjusted curve reaches its highest value).

Finally, we also tested correlations between the different variables. To do so, for tests 1 to 6 periodic cross-correlation were calculated. This type of correlation allows the estimation of correlation between variables that show periodicity, as well as the phase relationship among

them. In test 7 (LL), bivariate linear correlation were calculated between the variables studied as well as with environmental temperature.

The software used to calculate periodic regression was an ad hoc computer application (“Ritme v.6”, @ Antoni Díez-Noguera, University of Barcelona, 2012) written in C++ and tested with examples. Statistical analyses and comparisons were performed with SPSS® v.18.

Figure S1: Motor activity pattern of a representative animal indicating the lighting and temperature conditions during the experiment (right) and the days of data sample (left). Horizontal axis correspond to 48 hours and each line correspond to one day of the experiment. Animal’s movements are shown in dark (note: rhythm synchronized to 24 h in LD₁, LD₂, L_tD and LD_t; free running rhythm in DD₁ and DD₂; arrhythmicity under LL).

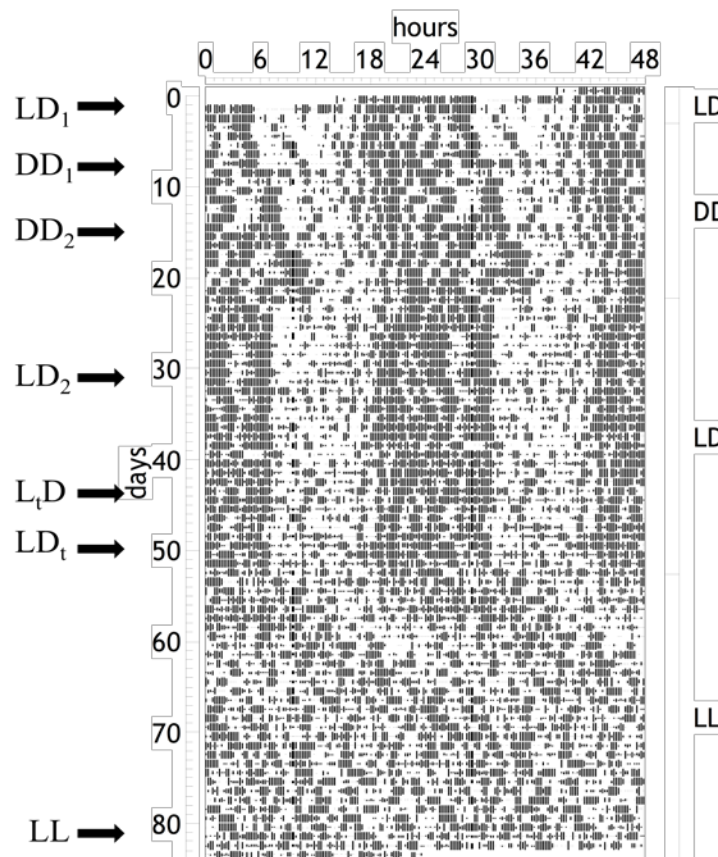


Figure S2: Daily profiles of the variables in the experimental days: Mean normalized values of the different variables studied (columns) in the six first tests (rows) are shown. In each experimental day, variables were measured every two hours. Bars indicate the standard error of the mean.

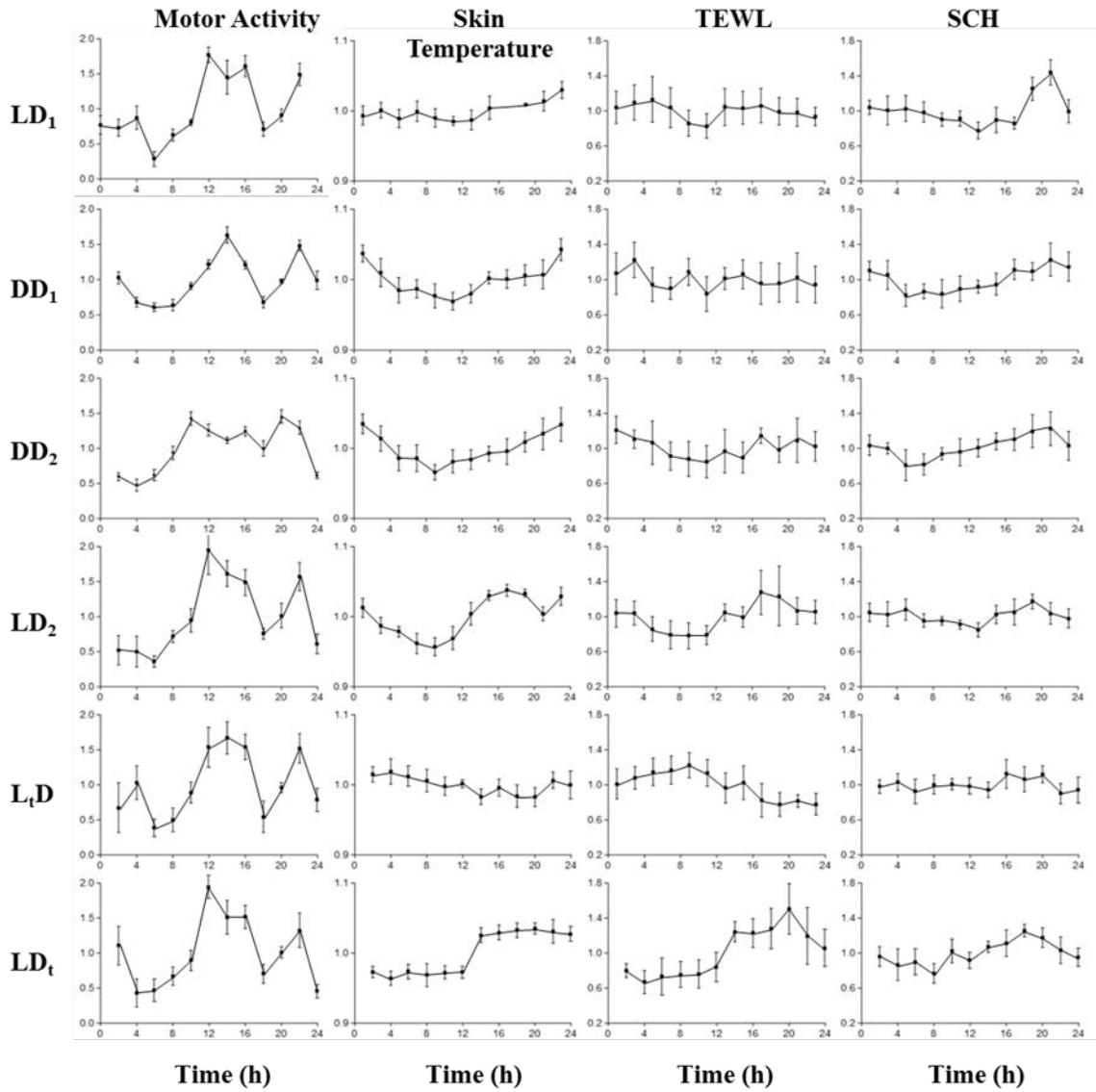
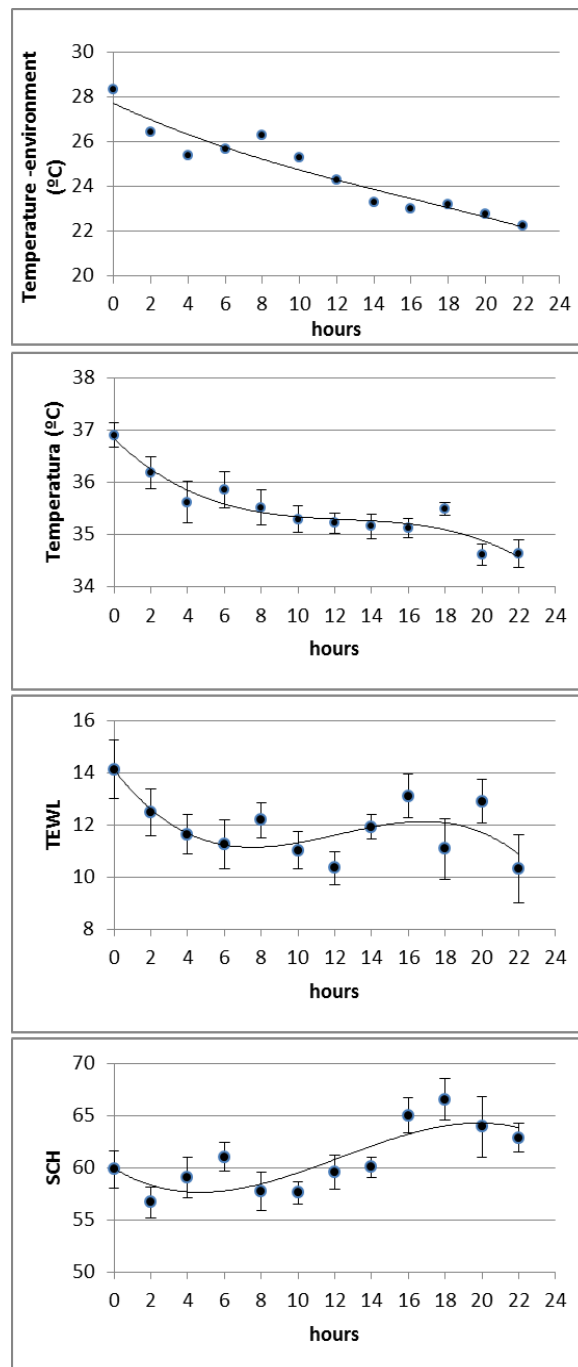


Figure S3: Results under constant light. From top to bottom: mean values of motor activity, environmental temperature, skin temperature, TEWL and SCH during 24 consecutive hours when animals were under LL (no circadian rhythms were detected). Environmental temperature had a value of 28°C at the beginning of the measures and 22°C after 24 hours. Although TEWL was directly correlated with temperature, this was not the case of SCH that showed an inverse correlation.



Artículo 4

**MELATONIN PHARMACOKINETICS AFTER TRANSDERMAL
ADMINISTRATION CHANGES ACCORDING TO THE TIME OF
THE DAY**

*(La farmacocinética de la melatonina, tras su administración por vía
transdérmica, varía en función de la hora del día)*

Ana Flo, Trinitat Cambras, Antoni Díez-Noguera, Ana C. Calpena

Artículo sometido a publicación

Resumen

Objetivo: El objetivo de este estudio fue comprobar si los ritmos biológicos de la piel y del organismo influyen en la farmacocinética de la MLT y de su metabolito AFMK, cuando la MLT se administra por vía transdérmica.

Métodos: Se aplicó la emulsión M68 (Artículo 2) a dos horas del día diferentes (*Zeitgeber times* ZT4 y ZT16) en rata *Hairless* y se extrajeron muestras de plasma a tiempos predefinidos que se analizaron mediante LC/MS/MS. Con el fin de obtener la biodisponibilidad por vía transdérmica y conocer los parámetros intrínsecos de distribución, metabolismo y eliminación, se estudió la cinética tras la administración IV a ZT4 y ZT16. Adicionalmente, se administró la misma dosis por vía oral en ZT16 para comparar la biodisponibilidad entre ambas vías. Al final del estudio se analizó la cantidad retenida en piel en ambos ZTs, para comprobar si existían diferencias en la cantidad de MLT presente en la piel a un tiempo determinado.

Resultados: Los resultados mostraron que los parámetros farmacocinéticos de la MLT dependen del ritmo circadiano. Cuando los datos IV se ajustaron a un modelo bicompartimental, la C_0 y la AUC_0^∞ , fueron mayores en ZT4, mientras que el CL_p , los V_1 , V_2 y V_{dss} fueron mayores en ZT16. Los datos obtenidos de la vía transdérmica se ajustaron mejor a un modelo monocompartimental, y se observó que t_{max} , $t_{1/2ka}$ y el AUC_0^∞ presentaban valores más altos en ZT4, mientras que la velocidad de absorción (P) y K_a eran mayores en ZT16. AFMK se detectó en todos los casos, pero no se observaron diferencias entre los dos ZTs. La cantidad de MLT retenida en piel también fue mayor en ZT4.

Conclusión: En base a los resultados del estudio, se sugiere que la fase de reposo es la más apropiada para la administración dérmica y transdérmica de MLT.

MELATONIN PHARMACOKINETICS AFTER TRANSDERMAL ADMINISTRATION CHANGES ACCORDING TO THE TIME OF THE DAY

AUTHORS

Ana Flo¹, Trinitat Cambras², Antoni Díez², Ana Calpena¹

¹Departament de Farmàcia i tecnologia farmacéutica. Facultat de Farmàcia, Universitat de Barcelona. Av. Joan XXIII s/n, 08028, Barcelona, Spain.

²Departament de Fisiologia. Facultat de Farmàcia, Universitat de Barcelona. Av. Joan XXIII s/n, 08028, Barcelona, Spain.

Running title: transdermal melatonin pharmacokinetics

***Corresponding author:**

Trinitat Cambras

Departament de Fisiologia

Facultat de Farmàcia

Av. Joan XIII s/n

08028 Barcelona

Spain

Tel (34)934024505

Fax (34)934035901

Key words:

Melatonin, circadian, pharmacokinetics, AFMK, hairless rats, skin, transdermal administration.

Abstract

Melatonin is a neurohormone with multiple and different actions, such as chronobiotic or antioxidant. Melatonin is usually orally administered, but a transdermal administration could be also useful in dermatological diseases or as adjuvant to radiotherapy to reduce cellular oxidation in the skin. The goal of this paper is to study the variability of the pharmacokinetics of melatonin and its metabolite AFMK, when melatonin is transdermally administered at two different times of day (Zeitgeber Time 4 (ZT4) and ZT16) in Hairless rat. Moreover, in order to obtain the bioavailability, kinetics after intravenous administration was also studied. In addition, a permeation study was carried out, at both ZTs, to test the amount of melatonin retained in the skin after transdermal administration. Results showed that pharmacokinetics parameters of melatonin administered exogenously depend on the time of the day. When intravenous data were fitted to a compartmental model, the extrapolated plasma concentration at time 0 and the area under the curve were higher at ZT4, while clearance, volumes of central and peripheral compartments and volume of distribution at the steady state were higher at ZT16. Transdermal administration was best fitted to a one-compartment model and t_{max} , half-life of absorption and area under the curve showed higher values at ZT4, while the absorption velocity and constant of absorption were higher at ZT16. AFMK was detected in all cases, but no differences between the two ZTs were observed. Transdermal administration showed better bioavailability also at ZT4. Results indicate circadian variation of pharmacokinetics and suggest the rest phase as the most appropriate time for transdermal administration of melatonin.

INTRODUCTION

Melatonin (N-acetyl-5-methoxytryptamine) is a neurohormone secreted primarily at night-time by the pineal gland of mammals. Melatonin has been reported to produce multiple and different actions such as a chronobiotic, acting on the circadian clock, or as antioxidant and anticarcinogenic molecule [1,2]. This hormone acts as a strong free radical scavenger, an activator of cytoprotective pathways and, at high concentrations, it attenuates or counteracts oxidative stress [2]. Melatonin has shown to be implicated in skin functions such as hair growth, fur pigmentation and melanoma control [3]. Moreover, activities of melatonin as a chemotoxicity and ionizing radiation protectant through different biological mechanisms and in a number of organs have also been documented [4].

Melatonin is usually orally administered, but, recently, many potential applications for transdermal melatonin have already been identified. For instance, in dermatology, since melatonin in the skin plays a role in preventing skin aging due to the protection of proteins from free radicals attack [5] and has been demonstrated to be useful to reduce UV erythema [6].

More recently, melatonin has also been proposed as an adjuvant to radiotherapy to reduce cellular oxidation [7]. Several clinical reports indicate that melatonin administration, either alone or in combination with traditional radiotherapy, results in a favorable efficacy-toxicity ratio during the treatment of human cancers [8], as well as it reduces oxidative stress induced by X-ray irradiation due to inhibition of lipid peroxidation [9]. Thus, to reduce the secondary effects of radiotherapy, it is of importance to develop dermal formulations with emollient properties that could help to maintain skin hydration

but also that contain a substance with antioxidant properties to capture free radicals produced by irradiation. Moreover, several melatonin metabolites, among them AFMK, also show antioxidative properties [10–12] which may increase its effects. Melatonin has a highly lipophilic molecular structure that facilitates skin penetration, and thus could be a good candidate in this sort of creams. Melatonin is an amphiphilic molecule [13] which fits with the 5 rules of de Lipinski for appropriate skin penetration: molar mass below 500 g/mol, a partition coefficient (referred as logP) of 1.18 at 28°C and the number of hydrogen-bond donors and the number of hydrogen-bond acceptors are below 5 and 10 respectively.

Melatonin pharmacokinetics has been widely studied after oral or IV administration [14,15] but there are very few studies about transdermal melatonin, as it also occurred in many other substances [15,16]. On the other hand, chronopharmacological studies show that drug effects may vary according to the time of day they are administered [17]. These differences are mainly due to circadian variations in multiple physiological variables, such as blood flow and binding to plasma proteins that influence drug's absorption, distribution, metabolism or elimination and have been demonstrated in both lab animals and human beings. [18–20].

Thus, as in the other routes of administrations, it is of importance to know whether the transdermal administration produces a different pharmacokinetic profile as a function of the time of the day. If this occurred, this could induce pharmacodynamic differences in the efficacy of the treatment, or in the secondary effects of the drug. In the skin, several studies have reported the presence of circadian rhythms in temperature, hydration or transepidermal water loss [21–23]. These variables may modify the stratum corneum, the main barrier for drug absorption and thus influence transdermal administration.

In the case of melatonin, it is worth to notice that, although many variables have been reported to influence its pharmacokinetics among them there is not circadian time [15]. Actually, the influence of the time of day on the effects of oral melatonin are important not only for circadian studies [24] but also for the study of metabolism, due to the different effects of melatonin on glucose tolerance between day and night [25].

Thus, the goal of this paper is to study the variability of the pharmacokinetics of melatonin and its metabolite AFMK when melatonin is transdermally administered at two different circadian times. To do so, we used hairless rats, a suitable animal model for dermatological studies [26], which received transdermal melatonin at ZT4 and ZT16. Moreover, in order to obtain the bioavailability of transdermal melatonin and to obtain the intrinsic pharmacokinetic disposition values in this animal model we also studied the pharmacokinetics through intravenous (IV) bolus at the same circadian times. Finally, we also added an oral administration to compare the bioavailability of both routes of administration. At the end of the experiment we carried out a retention study in the same animal model to test the amounts of melatonin that are retained in the skin at both ZTs.

MATERIAL AND METHODS

Animals and housing.

Five male Hairless Sprague-Dawley rats (Janvier, France) were used for the experiments. Rats arrived to the lab at the age of 4 weeks and were adapted to the experimental condition of 12:12-h light-dark cycles for one week (light: 350 lux of white light provided by a fluorescent lamp, dark: less than 0.5 lux of red light, both measured at cage level). Then, they were kept individually in transparent 50 × 25 × 12 cm methacrylate cages and transferred to sound-proof and temperature and humidity-conditioned cabins. Animals

had access to food and tap water *ad libitum*, and their cages were supplied with wood chippings for bedding, which were renewed weekly.

To test the behavior of the rats and the stability of their circadian rhythm, motor activity was recorded every 15 minutes, during the whole experiment, by means of activity-meters that used 2 perpendicular infrared beams that crossed at 5 cm above the floor of the cage. The experimental protocols were approved by the Institutional Animal Care and Use Committee of the University of Barcelona.

Experimental design.

At the age of 7 weeks, skin temperature, hydration and transepidermal water loss (TEWL) were determined every 2 hours, during 24 hours to ratify the presence of circadian rhythms in skin [23]. This was carried out by means of a Cutometer[®] MPA 580 (Courage and Khazaka, Electronic GmbH, Cologne, Germany), with a Skin Thermometer ST500, a Tewameter[®] TM 300 and a Corneometer[®] 825.

For the pharmacokinetic study, transdermal and IV administrations were performed at two different ZT (Zeitgeber time), ZT4 and ZT16 (ZT12 corresponds to lights offset, this is the onset of the activity phase).

The transdermal study at ZT16 was performed at the age of 10 weeks, and two weeks later the transdermal study at ZT4. Two months later, the IV study at ZT4 was performed and two weeks later the study of the same route at ZT16 was carried out.

The oral study was carried out at the age of 7 months. This assay was used to compare the bioavailability obtained in this route with the one obtained after transdermal

administration, and was performed only at ZT16, the time slot where the previous studies demonstrated the maximum temperature and transepidermal water loss [23].

Finally, at the end of the experiment, when the animals were 11 months, a skin retention study was performed. To do so, an emulsion containing 2% of melatonin, 5% of Montanov 68[®] (alkylpolyglucoside nonionic emulsifier, cetearyl glucoside and cetearyl alcohol, Mv), 5% of Medium chain triglycerides (MCTs), 5% of perhydroesqualene (PHE) and 83% of purified water was prepared. The manufacturing process was previously described in a paper of the same group [27]. Melatonin was purchased from Sigma-Aldrich (Madrid, Spain) and Mv, MCTs and PHE from Fagron Iberica (Barcelona, Spain). In these studies 0.5 g of the emulsion (corresponding to 10 mg of melatonin) was applied on the lower back skin of each rat, by a gentle massage, using gloves, until complete absorption was observed.

For IV administrations, a solution containing 0.25% of melatonin, 11% of ethanol 96% and qs of sterile saline was prepared. In this case, 0.2 ml of solution (corresponding to 0.5 mg of melatonin) was administered intravenously as a bolus injection in the caudal lateral vein.

For oral administration, a solution containing 0.67% of melatonin, 13% of ethanol 96% and qs of sterile saline was prepared. 1.5 ml of solution, containing 10 mg of melatonin, was administered directly in the stomach using a gastric cannula.

At each predefined time, about 150 μ l of blood was extracted from the tail vein by means of capillary tubes containing EDTA (Microvette CD300 K2E). Whole blood was centrifuged (5000 rpm) during 15 min at 10°C to obtain blood plasma. Plasma was frozen immediately at -80 degrees Celsius until analysis were carried out.

A retention study was carried out at the end of the experiment, determining the quantity of melatonin retained in the skin at each ZT. To do so, an amount of 0.25 g of formulation was applied on various delimited areas of 3.14 cm² of the back skin of each rat (obtaining a total of 9 delimited areas at ZT4 and 8 delimited areas at ZT16). After 45 min, the rats were sacrificed using carbon dioxide, following the recommendations for euthanasia of experimental animals from the European Commission [28], and the back skin was excised in order to analyze it.

Analytical methods

Two different analytical methods were used in the study: for the analysis of the plasma samples, a Mass Spectrometer (LC/MS/MS method) and for the samples obtained from the skin (retention study), a high-performance liquid chromatography (HPLC). The solvents and reagents were: acetonitrile, ethanol and methanol HPLC quality from Panreac (Barcelona, Spain). Double distilled water was used after filtration in a Milli-Q[®] Gradinet A10 system apparatus from Millipore Iberica S.A.U. (Madrid, Spain) to a resistivity of 18.2 MΩ cm.

LC/MS/MS

The plasma was analyzed using a Triple Quadrupole LC/MS/MS Mass Spectrometer which employed an ACQUITY UPLC System, COLUMNA and an API 3000 mass spectrometer (Perkin-Elmer Sciex Instruments) equipped with an ion turbo spray used in the positive ionization mode. Mobile phase A, was acetonitrile 0.1% formic acid and mobile phase B, was H₂O 0.1% formic acid. The UPLC program for this method consisted of a gradient from 5.0% to 99.0% of A (rest being B) in 7 min, a 1 min hold at 99.0% of A followed by a 4 min re-equilibration period at 5.0% of A. The flow rate was

0.75 ml/min and the column temperature was 45°C. The column used was a Luna C18 of 5µm, (150 x 2mm). This method was based on an on-line liquid chromatography–electrospray tandem mass spectrometry system, previously described in the literature [29], that allows determining in the same analysis both melatonin (mass 233.2/174.2 Da) and its metabolite AFMK (mass 265.0/178.0 Da). D₇-Melatonin standard (mass 240.2/178.2 Da) was supplied by Cerilliant Corporation (Texas, US) and AFMK standard was supplied by Vitro (Madrid, Spain). This method only permits the determination of unbounded melatonin, so melatonin bounded to plasmatic proteins could not be quantified.

HPLC method

The retained amount of melatonin in skin samples was quantified using a high-performance liquid chromatography (HPLC) previously validated according to international guidelines by the same group [27]. All HPLC assays were performed isocratically at room temperature. The HPLC system consisted of a Waters 515 pump with UV-VIS 2487 detector from Waters Corp. (Milford, MA, USA) set at 223 nm (λ_{\max}). A reverse-phase column SunFire C18 3.5µm (150×4.6mm) from Waters Corp. (Milford, MA, USA), with a mobile phase consisting of methanol:water (50:50), at a flow rate of 1mL/min, an injection volume of 50 µL was used. A calibration curve with a concentration range from 0.39 mg/mL to 50 mg/mL was used to measure the melatonin concentration of the samples.

Pharmacokinetic study

Data were first analysed using a non-compartmental pharmacokinetic model and later they were fitted to different compartmental models. Pharmacokinetic parameters were

calculated according to Domenech et al [30]. In all cases, models were calculated using the individual curves of each rat. Data points of the terminal phase were chosen based on visual inspection of the curves of concentration levels versus time.

The analyses of each data set to a non-compartmental model allowed the comparison of the means of the most relevant pharmacokinetic parameters between the two ZTs and the estimation of the bioavailability of melatonin in the transdermal and the oral studies.

The maximum plasma concentration (C_{max}) and the occurrence time of C_{max} (t_{max}) for each animal were directly obtained from the concentration data. The area under the plasma concentration–time curve extrapolated to infinity (AUC_0^∞) was calculated using Eq. (1). Where, AUC_{last} is the area under the plasma concentration–time curve until the last measurable time point calculated using the linear trapezoidal method, C_{last} is the last measurable concentration and λ_z is the rate constant associated with the slope of the terminal elimination phase.

$$AUC_0^\infty = AUC_{last} + \frac{C_{last}}{\lambda_z} \quad (1)$$

Where, AUC_{last} is the area under the plasma concentration–time curve until the last measurable time point calculated using the linear trapezoidal method, C_{last} is the last measurable concentration and λ_z is the rate constant associated with the slope of the terminal elimination phase.

The absolute bioavailability (F) was determined using Eq. (2).

$$F = \frac{AUC_{0ev}^\infty}{AUC_{0iv}^\infty} \times \frac{D_{iv}}{D_{ev}} \quad (2)$$

Where, AUC_{0iv}^∞ is the AUC_0^∞ obtained after IV administration; AUC_{0ev}^∞ is the AUC_0^∞ obtained after transdermal or oral administration; D_{iv} is the administered IV dose and D_{ev} is the administered transdermal or oral dose [31].

For both, transdermal and oral routes, the absorption velocity (P) was calculated using Eq. (3) [30,32].

$$P = \frac{C_{max}}{AUC_0^{\infty}} \quad (3)$$

The mean residence time (MRT) of a melatonin molecule in the organism was calculated using Eq. (4).

$$MRT = \frac{AUMC_0^{\infty}}{AUC_0^{\infty}} \quad (4)$$

Where, $AUMC_0^{\infty}$ is the area under the first moment curve.

Moreover, for the IV administration, the λ_z was determined using log-linear regression as defined in Eq. (5).

$$\ln C = -\lambda_z \cdot t + \ln C_0 \quad (5)$$

The plasma terminal half-life ($t_{1/2\lambda_z}$) was calculated using Eq. (6).

$$t_{1/2\lambda_z} = \frac{\ln(2)}{\lambda_z} \quad (6)$$

The plasmatic clearance (CL_P) was calculated from the plasma concentration data obtained from IV dosing as defined in Eq. (7).

$$CL_P = \frac{D_{iv}}{AUC_0^{\infty}} \quad (7)$$

The volume of distribution at steady state (V_{dss}) was obtained using Eq. (8).

$$V_{dss} = CL_P \times MRT_0^{\infty} \quad (8)$$

Where, MRT_0^{∞} is the MRT extrapolated to infinity obtained after IV administration [30].

Additionally, the same dataset obtained from the IV administration study was fitted to different compartmental pharmacokinetic models, in order to find out the best model according to Akaike's information criterion. This model provides more specific information about the distribution, metabolism and elimination of melatonin in Hairless rat than the non-compartmental model. The dataset from the transdermal administration

was also fitted to a compartmental pharmacokinetic model in order to obtain information regarding the absorption of the substance through the skin.

The additional parameters obtained by fitting the data set to a one-compartment model are: the microconstant of elimination (K_{10}) and the half-life of the microconstant of elimination ($t_{1/2 k10}$) for all the routes of administration, and the microconstant of absorption (K_a) and the half-life of the microconstant of absorption ($t_{1/2 ka}$), when the drug is administered using an extravasal route. When the dataset is fitted to a two-compartment model the parameters are: the disposition coefficients of the fast phase (A) and the slow phase (B) and their corresponding disposition constants (α and β , respectively); the microconstants of distribution from the central to the peripheral compartment (K_{12}), of return from the peripheral compartment to the central compartment (K_{21}) and of elimination (K_{10}), and their corresponding half-lives ($t_{1/2 k12}$, $t_{1/2 k21}$ and $t_{1/2 k10}$, respectively); the central and the peripheral volumes (V_c and V_p) and V_{dss} . Where V_c is directly calculated using Eq. (9), V_{dss} calculated according to Eq. (10) and V_p according to Eq. (11).

$$V_c = \frac{D}{C_0} \quad (9)$$

$$V_{dss} = V_c \left(1 + \frac{K_{12}}{K_{21}}\right) \quad (10)$$

$$V_p = V_{dss} - V_c \quad (11)$$

Data analysis

The data obtained from the LC/MS/MS was analyzed by means of *Winnonlin* (version 5.3, Pharsight Corporation, St Louis, MO, USA) software to obtain the pharmacokinetic parameters. Statistical analysis for comparison of the parameters obtained at ZT4 and

ZT16 was performed by a paired t-test using Minitab[®] software version 17.1.0 (Minitab Inc, State College, Pennsylvania, US).

The data obtained from the skin retention were statistically analyzed using Minitab[®] software. In this case the retained amount of melatonin in the skin at both ZTs was compared using a t-test for unpaired samples. Probability level was set at $p < 0.05$ for significance in all analysis.

RESULTS AND DISCUSSION

The rat has been widely used for dermatologic and cosmetic studies, since it has several advantages compared to other animals, such as pigs. For example, the purchasing and maintenance cost is lower and the handling is easier. The differences in structure [33] and permeability between rat and human skins are well known, so actually, some equations have been described to extrapolate the values obtained from rat to the human skin [26,34,35]. Moreover, the use of hairless rat in dermatological research [26,34] has advantages compared to hairy rat, since it is not necessary to manipulate their skin to perform the permeation studies, avoiding to cause skin lesions that may alter the results.

Before the pharmacokinetic study, we confirmed the presence of skin circadian rhythms for temperature, transepidermal water loss and skin hydration, whose acrophases occurred during the activity phase of rats (dark phase), as it was previously stated [23], which could play a role in the daily variations of melatonin pharmacokinetics.

The LC/MS/MS method resulted selective for the analysis of melatonin and AFMK (Fig. 1).

Intravenous administration

The pharmacokinetic results of the non-compartmental analysis of the IV administrations are shown in Table 1. A paired t-test indicated that, although the administered dose was the same for both ZT, statistically significant differences ($p < 0.05$) between ZT4 and ZT16 were found for C_0 , AUC_0^∞ , CL_P and V_{dss} . Comparing ZT4 vs ZT16, C_0 and AUC_0^∞ values were more than twice higher at ZT4, whereas CL_P and V_{dss} values were more than twice lower at the same ZT. These differences could be explained by differences in distribution, elimination or metabolism depending on the time of the day. For the other parameters, statistically significant differences were not found.

When a compartmental analysis was carried out, plasma concentration-time curve of melatonin administered IV was best described by a two-compartment model (Fig. 2) for all the rats, excepting one case that was best described by a one-compartment model and thus excluded from this analysis. The parameters obtained by fitting the data points to this model are shown in Table 2. A paired t-test demonstrated statistically significant differences between ZT4 and ZT16 for some parameters, C_0 , A and AUC_0^∞ where higher at ZT4 than at ZT16 while V_c , V_p , CL_P and V_{dss} where lower at ZT4. No statistically significant differences were observed for the fast (α) or slow (β) disposition constants.

The literature describes that for both humans and rodents, these processes are not constant but they present circadian fluctuations, tending to show higher values during the activity phase [18–20,36–38]. In that sense, differences in blood flow modify the velocity of distribution of substances in the central compartment and towards extravascular structures, obtaining higher distribution volumes [30]. If a high blood flow arrives to an organ, it may increase the velocity of depuration of the substance and higher values of

CL_P would be obtained [18]. The higher blood flow levels during the activity phase of the rat may explain that, despite administering the same dose, different values for C_0 , AUC_0^∞ , V_{dss} and CL_P were obtained at the two ZTs. Significant differences in melatonin pharmacokinetic parameters in rat after bolus or infusion administration depending on the time of the day have been previously reported, for example, Chan et al. also observed that at mid-dark, CL_P , V_c and V_p were significantly higher than at mid-light [39]. However, they found higher volumes for V_p than for V_c , which was the contrary in our case. According to Eq. (10) and Eq. (11) $V_p > V_c$ when the ratio K_{12}/K_{21} is > 1 , thus the microconstant of return is lower than one of distribution and exists a risk of accumulation of the substance in the peripheral tissues. In our study, we found that melatonin has a higher K_{21} than K_{12} , indicating a low risk of accumulation of the substance in the peripheral tissues. Moreover, V_c and V_p values were higher at ZT16 compared with those at ZT4, but this difference was stronger in V_p , with values tenfold higher at ZT16.

CL_P is the sum of the all the individual clearances in the various depurative organs, such as liver (CL_H) or kidneys (CL_R). In our study we did not measure the individual CL , so assumptions should be done with caution. CL_P was highest at ZT16, activity phase of the rat, which corresponds with the highest blood flow and the maximum hepatic body flow [18]. Taking into account that melatonin has a high hepatic extraction rate [14], very influenced by fluctuations in the blood flow [30], we can hypothesize that this difference is due to CL_H . This assumption differs from the study of Huether et al. that show not significant differences in the hepatic metabolism depending on the time of the day [40].

These authors observed that despite infusing the same dose of melatonin, lower steady state concentrations of melatonin were found during dark-phase. It is widely known that melatonin in plasma is partially bounded to albumin [41] and that albumin concentration has a circadian rhythm with maximum levels during activity phase [41,42]. Thus, we trust

that the differences we found in C_0 and AUC_0^∞ , with higher values at ZT4 than at ZT16, could be justified at least in part, by the fixation of melatonin to albumin, since the analytical method used herewith to determine the plasmatic melatonin only detects the free molecule and not the fraction bounded to protein.

The values obtained for the IV CL_P in rats are between 10% and 75% of the hepatic blood flow (HBF), which can be qualified as moderate according to the paper from Davies and Morris [43], resulting in moderate values of $t_{1/2}$ at both ZTs. Also the values of V_{dss} indicate that melatonin has a moderate volume of distribution in Hairless rat.

Transdermal administration

Plasma concentration-time curves of melatonin administered transdermally at ZT4 and ZT16 are shown in Fig. 2. The pharmacokinetic results of the non-compartmental analysis of the transdermal administrations are presented in Table 1. Statistically significant differences ($p < 0.05$) were found between ZT4 and ZT16 for AUC_0^∞ , MRT, F and P. As in the case of the IV study, AUC_0^∞ was much higher at ZT4 than at ZT16, but also MRT and bioavailability (F) values were higher at ZT4. The bioavailability, in percentage, was 2.1% ($\pm 0.9\%$) at ZT16 and 5.9% ($\pm 3.6\%$) at ZT4, this difference might be significantly important if the product is used for systemic action.

The parameter P that reflects the contrast between the constant of absorption and that of disposition was statistically higher at ZT16, 0.98 (± 0.15), than at ZT4, 0.30 (± 0.10) ($p < 0.001$, Paired t-test).

Experimental data obtained in the transdermal route did not fit a two-compartment model, which could be due to the properties of melatonin that has several pathways of

metabolism and is quickly transformed into its metabolites, especially while it passes through the skin [11,12]. Nevertheless, in order to obtain the absorption constant (K_a), a one-compartment model was used to fit the data. The results are shown in Table 3. The compartmental analysis showed statistically significant differences for K_a , $t_{1/2K_a}$, t_{max} and AUC_0^∞ . The K_a was statistically higher at ZT16 than at ZT4. For t_{max} , the compartmental analysis showed that the maximum concentration of melatonin in plasma at ZT16 occurred earlier than at ZT4 and that the half-life of K_a was statistically longer at ZT4.

The fact that AUC_0^∞ presented higher values during the rest phase than during the activity phase can be due to the fact that the absorption of melatonin transdermally applied is faster during the activity phase of the animal than during the rest phase. This is suggested because K_a and the absorption velocity, P , obtained in the compartmental analysis, are higher at ZT16 than at ZT4.

To our knowledge, only two studies have been published about circadian differences in skin absorption after drug administration [44,45], and both concluded that there are differences in C_{max} and t_{max} depending on the time of administration. Bruguerolle et al. observed that when lidocaine was transdermally administered to rats, higher concentrations were found during the morning, i.e. the rest phase, which agree with our results [45].

During the activity of the rats, the maximum levels of TEWL and skin hydration are reached and skin temperature and the blood flow increase. These variables promote drug absorption during the activity phase [18,22,46], and thus, they could contribute to the differences we found between the two ZTs. Moreover, the fact that t_{max} occurred earlier and that K_a half-life was statistically lower when melatonin was administered during the

activity phase would facilitate the passage of melatonin through the skin. The absolute bioavailability of melatonin by transdermal route was small, 2% at ZT16 and 6% at ZT4, which means that it would be more melatonin available to exert its actions at ZT4 than at ZT16.

Oral administration

Plasma concentration levels versus time curve of melatonin administered orally at ZT16 is shown in Fig. 2. The pharmacokinetic results of the non-compartmental analysis are shown in Table 1. Comparing the transdermal and the oral administrations at the same ZT, it was shown that while the bioavailability of the oral route is tenfold higher than the transdermal route, the velocity of absorption is significantly higher using the transdermal route than the oral one.

At ZT16, a much higher AUC_0^∞ is obtained after oral than transdermal administration, although the same melatonin dose has been administered. Thus, although the oral route is better than the transdermal for the systemic actions of melatonin, there could be circumstances, such as advanced cancer in the digestive tract or swallowing problems, when the oral administration is limited or discouraged, in which the transdermal route would be a good alternative. Furthermore, in the case of radiation applied to the skin for cancer treatment, since radiation has secondary effects such as xerosis and dermatoses [7] transdermal route could be of help. In this sense, and in addition, Montanov 68, component of the formulation, is moisturizing with restructuring properties [47], and could also help to palliate the adverse effects of X-ray or γ radiation [8,9,48].

AFMK

Metabolites of melatonin produced through kynuric and indolic pathways have been widely described [10,12,49]. Some of them, such as AFMK and its metabolite AMK, have potent antioxidant properties [2]. AFMK is generated by the interaction of melatonin with several agents, such as H_2O_2 , cytochrome C, 1O_2 , carbonate radical and $ONOO^-$. Moreover, in the skin is also generated through photocatalysis induced by UVB [12,49].

The metabolite AFMK was quantified from the same samples used for melatonin. The non-compartmental study showed not statistically significant differences in any of the parameters studied (Fig. 3).

When C_{max} and AUC_0^∞ , were normalized by the dose, C_{max}/D showed the highest values after the IV administration and the minimum values after the oral administration. Nevertheless, when comparing AUC_0^∞/D , the values were very similar for IV and transdermal routes, but not for the oral route, that showed significantly lower values (Table 4).

The differences in C_{max}/D could be explained considering that using an extravasal route, if the AFMK metabolizing route is used, melatonin is transformed into AFMK before reaching the systemic circulation [12,49], and this into AMK [11], causing that AFMK was not longer detected.

For AUC_0^∞/D , the lower values of AFMK after the oral administration could be explained because in this route, during hepatic first pass, the major metabolites produced are 6-hydroxymelatonin and N-acetyl-5-hydroxytryptamine [50], although other minor metabolites, such as AFMK[50], that can be transformed during the pass through the liver into AMK are produced.

AFMK and AMK are as potent antioxidants as melatonin, so when melatonin is transformed into these metabolites the antioxidant activity is increased [10]. In that sense, considering AFMK levels, since AUC_0^∞/D and $t_{1/2 \lambda_z}$ are higher in the transdermal route, we can suggest that this route would maintain the antioxidant capacity during more time than the oral route, and that the antioxidant effects arising from AFMK would be higher.

No statistically significant differences were found between ZTs for t_{max} neither in the IV nor in the transdermal administrations. For IV route, t_{max} values were 27 (± 9) min at ZT16 and at ZT4 were between 18 (± 7) min. For the transdermal study, this parameter presented a high variability depending on the rat with t_{max} values ranging from 15 to 139 min at ZT16 and from 62 to 183 min at ZT4.

Skin retention

The analysis of the amount of melatonin retained in the skin showed statistically significant differences ($p < 0.05$) between the study performed at ZT4 and the one performed at ZT16. At ZT4, 0.42 (± 0.14) mg melatonin/g of skin were found and at ZT16 0.28 (± 0.11) mg melatonin/g of skin.

As mentioned above, blood flow, temperature, skin hydration and TEWL showed higher values during the activity phase than during the rest phase [22]. This could imply that the amount of melatonin that passes through the skin into systemic circulation should be also higher at night and, as a result, the levels found in skin at ZT16 were smaller than at ZT4. To our knowledge, there are no previous studies about the retained amount of melatonin in the skin at two different ZTs. Our results demonstrate that the transdermal administration of the same amount of melatonin at both ZTs leads to differences in the quantity of this substance in the skin. Therefore the quantity of available melatonin for

local action, and thus, its pharmacological effects could vary. Therefore, our experiment highlights the importance of including the time of administration as a variable when studies of skin permeation are performed, because these differences in the retained amount could be of important for the pharmacological effects in the skin.

The results of the amount of melatonin retained in the skin *in vivo* could be used to extrapolate the quantity of melatonin that would be found in humans using the equations provided by Godin and Touitou [34] if data from *ex vivo* permeation studies both in humans and in Hairless rat would be available.

In summary, this study shows that, as it has been observed for other routes, it is important to consider the time of day at which a drug is administered transdermally, since the phases of absorption, distribution, metabolism and disposal may vary and influence the pharmacodynamics of the substances. Melatonin, administered transdermally, has a different pharmacokinetic behavior when applied at ZT16 or ZT4 in Hairless rats, and it is expected that similar differences would also be observed in humans. The best bioavailability together with the highest AUC_0^∞ and MRT, the smallest CL_P and the highest amounts of melatonin retained in the skin, that have been shown at ZT4, suggest that the rest phase is the most appropriate time to administrate this melatonin formulation in order to obtain high systemic or local levels. These results should encourage further research in humans to establish the best time of the day to administer melatonin transdermally according to the use wanted for this substance.

DECLARATION OF INTEREST STATEMENT

The authors report no conflicts of interest.

Acknowledgments

To Alexander Parra for his technical assistance. To the Scientific and Technological centers of the University of Barcelona, namely to Isidre Casals and David Bellido for analyzing the plasma samples. This work was partially supported by the “Ministerio de Educación y Ciencia” project: BFU2008-00199.

AUTHORS CONTRIBUTIONS

All the authors are responsible of the concept and design of the experiment, acquisition of data, data analysis, data interpretation and drafting of the manuscript. All the authors read and approved the final manuscript.

REFERENCES

- [1] A. Slominski, D.J. Tobin, M.A. Zmijewski, J. Wortsman, R. Paus, Melatonin in the skin: synthesis, metabolism and functions., *Trends Endocrinol. Metab.* 19 (2008) 17–24. doi:10.1016/j.tem.2007.10.007.
- [2] H.-M. Zhang, Y. Zhang, Melatonin: a well-documented antioxidant with conditional pro-oxidant actions., *J. Pineal Res.* 57 (2014) 131–146. doi:10.1111/jpi.12162.
- [3] K. Kleszczyński, L.H. Hardkop, T.W. Fischer, Differential effects of melatonin as a broad range UV-damage preventive dermato-endocrine regulator., *Dermatoendocrinol.* 3 (2011) 27–31. doi:10.4161/derm.3.1.14842.
- [4] A. Sánchez, A.C. Calpena, B. Clares, Evaluating the Oxidative Stress in Inflammation: Role of Melatonin, *Int. J. Mol. Sci.* 16 (2015) 16981. doi:10.3390/ijms160816981.
- [5] A.T. Slominski, K. Kleszczyński, I. Semak, Z. Janjetovic, M.A. Zmijewski, T.-K. Kim, et al., Local melatonergic system as the protector of skin integrity., *Int. J. Mol. Sci.* 15 (2014) 17705–17732. doi:10.3390/ijms151017705.
- [6] C. Scheuer, H.-C. Pommegaard, J. Rosenberg, I. Gögenur, Melatonin’s protective effect against UV radiation: a systematic review of clinical and experimental studies., *Photodermatol. Photoimmunol. Photomed.* 30 (2014) 180–8. doi:10.1111/phpp.12080.
- [7] R. Di Franco, E. Sammarco, M.G. Calvanese, F. De Natale, S. Falivene, A. Di Lecce, et al., Preventing the acute skin side effects in patients treated with radiotherapy for breast cancer: the use of corneometry in order to evaluate the protective effect of

- moisturizing creams., *Radiat. Oncol.* 8 (2013) 57. doi:10.1186/1748-717X-8-57.
- [8] Vijayalaxmi, R.J. Reiter, D.-X. Tan, T.S. Herman, C.R.J. Thomas, Melatonin as a radioprotective agent: a review., *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* 59 (2004) 639–653. doi:10.1016/j.ijrobp.2004.02.006.
- [9] B.C. Kim, B.S. Shon, Y.W. Ryoo, S.P. Kim, K.S. Lee, Melatonin reduces X-ray irradiation-induced oxidative damages in cultured human skin fibroblasts., *J. Dermatol. Sci.* 26 (2001) 194–200.
- [10] D.-X. Tan, L.C. Manchester, M.P. Terron, L.J. Flores, R.J. Reiter, One molecule, many derivatives: a never-ending interaction of melatonin with reactive oxygen and nitrogen species?, *J. Pineal Res.* 42 (2007) 28–42. doi:10.1111/j.1600-079X.2006.00407.x.
- [11] T.-K. Kim, Z. Lin, W. Li, R.J. Reiter, A.T. Slominski, N1-Acetyl-5-Methoxykynuramine (AMK) is produced in the human epidermis and shows antiproliferative effects., *Endocrinology.* 156 (2015) 1630–1636. doi:10.1210/en.2014-1980.
- [12] T.-K. Kim, K. Kleszczynski, Z. Janjetovic, T. Sweatman, Z. Lin, W. Li, et al., Metabolism of melatonin and biological activity of intermediates of melatonergic pathway in human skin cells., *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* 27 (2013) 2742–2755. doi:10.1096/fj.12-224691.
- [13] C.S. Shida, A.M. Castrucci, M.T. Lamy-Freund, High melatonin solubility in aqueous medium., *J. Pineal Res.* 16 (1994) 198–201.
- [14] E.A. Lane, H.B. Moss, Pharmacokinetics of Melatonin in Man: First Pass Hepatic Metabolism, *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 61 (1985) 1214–1216. doi:10.1210/jcem-61-6-1214.
- [15] N. Harpsøe, L. Andersen, I. Gögenur, J. Rosenberg, Clinical pharmacokinetics of melatonin: a systematic review, *Eur. J. Clin. Pharmacol.* 71 (2015) 901–909. doi:10.1007/s00228-015-1873-4.
- [16] J. Zempleni, J.R. Galloway, D.B. McCormick, Pharmacokinetics of orally and intravenously administered riboflavin in healthy humans., *Am. J. Clin. Nutr.* 63 (1996) 54–66.
- [17] F. Halberg, E. Halberg, Chronopharmacology and further steps toward chronotherapy, in: L.Z. Benet, N. Massoud, J.G. Gambertoglio (Eds.), *Pharmacokinetic Basis Drug Treat.*, Raven Press, 1984: pp. 221–248.
- [18] M. Baraldo, The influence of circadian rhythms on the kinetics of drugs in humans., *Expert Opin. Drug Metab. Toxicol.* 4 (2008) 175–192. doi:10.1517/17425255.4.2.175.
- [19] F. Levi, U. Schibler, Circadian rhythms: mechanisms and therapeutic implications., *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 47 (2007) 593–628. doi:10.1146/annurev.pharmtox.47.120505.105208.
- [20] A. Boulamery, G. Kadra, N. Simon, T. Besnard, P.B. Bruguerolle, Chronopharmacokinetics of Imipenem in the Rat, *Chronobiol. Int.* 24 (2007) 961–968. doi:10.1080/07420520701648309.

- [21] F. Berthaud, M. Boncheva, Correlation between the properties of the lipid matrix and the degrees of integrity and cohesion in healthy human Stratum corneum, *Exp. Dermatol.* 20 (2011) 255–262. doi:10.1111/j.1600-0625.2010.01164.x.
- [22] M.-A. Bolzinger, S. Briançon, J. Pelletier, Y. Chevalier, Penetration of drugs through skin, a complex rate-controlling membrane, *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.* 17 (2012) 156–165. doi:10.1016/j.cocis.2012.02.001.
- [23] A. Flo, A. Díez-Noguera, A.C. Calpena, T. Cambras, Circadian rhythms on skin function of hairless rats: light and thermic influences, *Exp. Dermatol.* 23 (2014) 214–216. doi:10.1111/exd.12338.
- [24] N.S. Gooneratne, A.Y.Z. Edwards, C. Zhou, N. Cuellar, M.A. Grandner, J.S. Barrett, Melatonin pharmacokinetics following two different oral surge-sustained release doses in older adults., *J. Pineal Res.* 52 (2012) 437–445. doi:10.1111/j.1600-079X.2011.00958.x.
- [25] P. Rubio-Sastre, F.A.J.L. Scheer, P. Gomez-Abellan, J.A. Madrid, M. Garaulet, Acute melatonin administration in humans impairs glucose tolerance in both the morning and evening., *Sleep.* 37 (2014) 1715–1719.
- [26] E.C. Jung, H.I. Maibach, Animal Models for Percutaneous Absorption, in: V.P. Shah, H.I. Maibach, J. Jenner (Eds.), *Top. Drug Bioavailability, Bioequivalence, Penetration SE - 2*, Springer New York, 2014: pp. 21–40. doi:10.1007/978-1-4939-1289-6_2.
- [27] A.F. Sierra, M.L.G. Ramírez, A.C.C. Campmany, A.R. Martínez, B.C. Naveros, In vivo and in vitro evaluation of the use of a newly developed melatonin loaded emulsion combined with UV filters as a protective agent against skin irradiation, *J. Dermatol. Sci.* 69 (2013) 202–214. doi:10.1016/j.jdermsci.2012.10.013.
- [28] B. Close, K. Banister, V. Baumans, E.M. Bernoth, N. Bromage, J. Bunyan, et al., Recommendations for euthanasia of experimental animals: Part 2. DGXT of the European Commission., *Lab. Anim.* 31 (1997) 1–32.
- [29] E.A. Almeida, G.R. Martinez, C.F. Klitzke, M.H.G. Medeiros, P. Di Mascio, Oxidation of melatonin by singlet molecular oxygen (O₂(¹Δg)) produces N1-acetyl-N2-formyl-5-methoxykynurenine, *J. Pineal Res.* 35 (2003) 131–137. doi:10.1034/j.1600-079X.2003.00066.x.
- [30] J. Doménech, J. Martínez, C. Peraire, *Tratado general de Biofarmacia y Farmacocinética*, 1st ed., Editorial Síntesis, S.A., Madrid, 2013.
- [31] J. Doménech, J. Martínez, J.M. Plá, *Biofarmacia y Farmacocinética, Volumen II: Biofarmacia*, 1st ed., Editorial Síntesis, S.A., Madrid, 1998.
- [32] L. Endrenyi, S. Fritsch, W. Yan, C_{max}/AUC is a clearer measure than C_{max} for absorption rates in investigations of bioequivalence., *Int. J. Clin. Pharmacol. Ther. Toxicol.* 29 (1991) 394–399.
- [33] A.T. Slominski, M.A. Zmijewski, C. Skobowiat, B. Zbytek, R.M. Slominski, J.D. Steketee, Sensing the environment: regulation of local and global homeostasis by the skin's neuroendocrine system., *Adv. Anat. Embryol. Cell Biol.* 212 (2012) v, vii, 1–115.
- [34] B. Godin, E. Touitou, Transdermal skin delivery: predictions for humans from in

- vivo, ex vivo and animal models., *Adv. Drug Deliv. Rev.* 59 (2007) 1152–1161. doi:10.1016/j.addr.2007.07.004.
- [35] B. van Ravenzwaay, E. Leibold, The significance of in vitro rat skin absorption studies to human risk assessment, *Toxicol. Vitro.* 18 (2004) 219–225. doi:10.1016/j.tiv.2003.08.002.
- [36] F.M. Radzialowski, W.F. Bousquet, Daily rhythmic variation in hepatic drug metabolism in the rat and mouse, *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 163 (1968) 229–238. <http://jpet.aspetjournals.org/content/163/1/229.abstract>.
- [37] B. Lemmer, K. Bathe, Stereospecific and circadian-phase-dependent kinetic behavior of d,l-, l-, and d-propranolol in plasma, heart, and brain of light-dark-synchronized rats., *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 4 (1982) 635–644.
- [38] M. Pons, O. Forpomes, S. Espagnet, J. Cambar, Relationship between circadian changes in renal hemodynamics and circadian changes in urinary glycosaminoglycan excretion in normal rats., *Chronobiol. Int.* 13 (1996) 349–358.
- [39] M.-Y. Chan, S.F. Pang, P.L. Tang, G.M. Brown, Studies on the Kinetics of Melatonin and N-Acetylserotonin in the Rat at Mid-Light and Mid-Dark, *J. Pineal Res.* 1 (1984) 227–236. doi:10.1111/j.1600-079X.1984.tb00214.x.
- [40] G. Huether, W. Kochen, T.J. Simat, S. Hans, Tryptophan, Serotonin, and Melatonin: Basic aspects and Applications, 1999. doi:10.1007/978-1-4615-4709-9.
- [41] D.P. Cardinali, H.J. Lynch, R.J. Wurtman, Binding of Melatonin to Human and Rat Plasma Proteins, *Endocrinology.* 91 (1972) 1213–1218. doi:10.1210/endo-91-5-1213.
- [42] C. Agrasal, A.I. Esquifino, M. Garcia-Bonacho, C.F. Reyes-Toso, D.P. Cardinali, Effect of melatonin on 24h changes in plasma protein levels during the preclinical phase of Freund's adjuvant arthritis in rats., *Chronobiol. Int.* 18 (2001) 435–446.
- [43] B. Davies, T. Morris, *Physiological Parameters in Laboratory Animals and Humans*, *Pharm. Res.* 10 (1993) 1093–1095. doi:10.1023/A:1018943613122.
- [44] A.E. Reinberg, E. Soudant, C. Koulbanis, R. Bazin, A. Nicolai, M. Mechkouri, et al., Circadian dosing time dependency in the forearm skin penetration of methyl and hexyl nicotinate., *Life Sci.* 57 (1995) 1507–1513.
- [45] B. Bruguerolle, E. Giaufre, M. Prat, Temporal variations in transcutaneous passage of drugs: the example of lidocaine in children and in rats., *Chronobiol. Int.* 8 (1991) 277–282.
- [46] Y. Shahzad, R. Louw, M. Gerber, J. du Plessis, Breaching the skin barrier through temperature modulations., *J. Control. Release.* 202 (2015) 1–13. doi:10.1016/j.jconrel.2015.01.019.
- [47] S. Savic, M. Savic, S. Tamburic, G. Vuleta, S. Vesic, C.C. Muller-Goymann, An alkylpolyglucoside surfactant as a prospective pharmaceutical excipient for topical formulations: the influence of oil polarity on the colloidal structure and hydrocortisone in vitro/in vivo permeation., *Eur. J. Pharm. Sci.* 30 (2007) 441–450. doi:10.1016/j.ejps.2007.01.006.
- [48] T.W. Fischer, A. Slominski, M. a Zmijewski, R.J. Reiter, R. Paus, Melatonin as a major skin protectant: from free radical scavenging to DNA damage repair., *Exp.*

Dermatol. 17 (2008) 713–30. doi:10.1111/j.1600-0625.2008.00767.x.

[49] T.-K. Kim, Z. Lin, W.J. Tidwell, W. Li, A.T. Slominski, Melatonin and its metabolites accumulate in the human epidermis in vivo and inhibit proliferation and tyrosinase activity in epidermal melanocytes in vitro., *Mol. Cell. Endocrinol.* 404 (2015) 1–8. doi:10.1016/j.mce.2014.07.024.

[50] X. Ma, J.R. Idle, K.W. Krausz, D.-X. Tan, L. Ceraulo, F.J. Gonzalez, Urinary metabolites and antioxidant products of exogenous melatonin in the mouse., *J. Pineal Res.* 40 (2006) 343–349. doi:10.1111/j.1600-079X.2006.00321.x.

TABLES

Table 1. Non compartmental pharmacokinetics parameters (mean \pm SD) estimated of melatonin after a single IV administration of melatonin solution at a dose of 0.5 mg at ZT16 and ZT4, after transdermal administration (TD) of 10 mg of melatonin at ZT16 and ZT4 and after an oral administration of 10 mg of melatonin at ZT16 .

Parameter	IV ZT16 Mean \pm SD	IV ZT4 Mean \pm SD	TD ZT16 Mean \pm SD	TD ZT4 Mean \pm SD	ORAL ZT16 Mean \pm SD
$t_{1/2 \lambda z}$ (min)	55.10 \pm 44.58	42.14 \pm 19.33	-	-	-
AUC_0^∞ (h \cdot μ g/mL)	0.88 \pm 0.47 ¹	2.18 \pm 0.96	0.31 \pm 0.11 ²	2.16 \pm 1.40	3.66 \pm 2.07 ³
CL _P (mL/min \cdot kg)	23.23 \pm 8.69 ¹	9.65 \pm 4.71	-	-	-
MRT _{INF} (h)	0.64 \pm 0.13	0.54 \pm 0.15	1.42 \pm 0.94 ²	4.12 \pm 1.91	1.37 \pm 0.23
V _{dss} (mL/kg)	903.3 \pm 381.6 ¹	287.0 \pm 81.7	-	-	-
C ₀ (μ g/mL)	1.50 \pm 0.98 ¹	3.83 \pm 1.48	-	-	-
C _{max} (μ g/mL)	-	-	0.30 \pm 0.08	0.64 \pm 0.41	2.05 \pm 1.21 ³
t _{max} (min)	-	-	32 \pm 18	151 \pm 127	46 \pm 18
F	-	-	0.02 \pm 0.01 ²	0.06 \pm 0.04	0.26 \pm 0.15 ³
P	-	-	0.98 \pm 0.15 ²	0.30 \pm 0.10	0.59 \pm 0.16 ³

$t_{1/2 \lambda z}$ = elimination half-lives; AUC_0^∞ = area under the concentration-time curve; CL_P = plasmatic clearance; MRT_{INF} = mean residence time; V_{dss} = volume of distribution at steady state; C₀ = extrapolated plasma concentration at time 0; C_{max} = maximum plasma concentration; t_{max} = time to maximum concentration; F = bioavailability; P = absorption velocity. n = 5 rats for all groups except for oral ZT16, where n = 4 rats. Statistically significant differences (p<0.05): ¹ IV route ZT4 vs ZT16; ² TD ZT4 vs ZT16; ³ TD ZT16 vs oral route ZT16.

Table 2. Two-compartment pharmacokinetics parameters (mean \pm SD) estimated of melatonin following a single IV administration of melatonin solution at a dose of 0.5 mg at ZT16 and ZT4.

Parameter	ZT16 Mean \pm SD	ZT4 Mean \pm SD
C ₀ (μ g/mL)	1.88 \pm 0.58*	4.06 \pm 1.61
A (μ g/mL)	1.82 \pm 0.55*	3.99 \pm 1.66
α (1/h)	2.14 \pm 0.57	1.87 \pm 0.43
t _{1/2} α (h)	0.34 \pm 0.07	0.39 \pm 0.10
B (μ g/mL)	0.06 \pm 0.04	0.10 \pm 0.06
β (1/h)	0.48 \pm 0.14	0.75 \pm 0.41
t _{1/2} β (h)	1.58 \pm 0.59	1.23 \pm 0.82
t _{1/2} K ₁₀ (h)	0.37 \pm 0.07	0.40 \pm 0.09
K ₁₀ (1/h)	1.93 \pm 0.46	1.79 \pm 0.36
K ₁₂ (1/h)	0.16 \pm 0.11	0.05 \pm 0.04
K ₂₁ (1/h)	0.53 \pm 0.14	0.78 \pm 0.42
AUC ₀ ^{∞} (h $\cdot\mu$ g/mL)	1.00 \pm 0.34*	2.36 \pm 0.94
CL _P (mL/min \cdot kg)	18.15 \pm 4.86*	8.57 \pm 4.24
MRT (h)	0.72 \pm 0.07	0.63 \pm 0.11
V _{dss} (mL/kg)	789.9 \pm 263.0*	307.6 \pm 110.6
V _c (mL/kg)	569.4 \pm 115.7*	284.3 \pm 104.1
V _p (mL/kg)	220.5 \pm 230.0*	23.3 \pm 17.0

C₀ = extrapolated plasma concentration at time 0; A, B = coefficients; α , β = disposition constants; t_{1/2} α , t_{1/2} β , t_{1/2} K₁₀ = half-lives; K₁₀, K₁₂, K₂₁ = microconstants of elimination, distribution and return, respectively; AUC₀ ^{∞} = area under the concentration-time curve; CL_P = plasmatic clearance; MRT = mean residence time; V_{dss} = volume of distribution at steady state; V_c, V_p = volume of central and peripheral compartments. (*) statistically significant differences paired t-test (p<0.05).

Table 3. One-compartment pharmacokinetics parameters (mean \pm SD) estimated of melatonin following a single transdermal administration of melatonin emulsion at a dose of 10 mg at ZT16 and ZT4.

Parameter	ZT16	ZT4
t_{\max} (min)	29.70 \pm 10.14*	98.78 \pm 33.06
C_{\max} (μ g/mL)	0.18 \pm 0.03	0.44 \pm 0.30
K_a (1/h)	4.56 \pm 1.55*	0.97 \pm 0.41
$t_{1/2 K_a}$ (min)	9.98 \pm 3.23*	52.59 \pm 30.83
K_{10} (1/h)	0.87 \pm 0.37	0.44 \pm 0.16
$t_{1/2 K_{10}}$ (min)	56.64 \pm 27.43	105.27 \pm 35.92
AUC_0^∞ (h \cdot μ g/mL)	0.34 \pm 0.08*	1.98 \pm 1.07

t_{\max} = time to maximum concentration; C_{\max} = maximum concentration; K_a , K_{10} = microconstants of absorption and elimination, respectively; $t_{1/2 K_a}$, $t_{1/2 K_{10}}$ = half-lives of absorption and elimination, respectively; AUC_0^∞ = area under the concentration-time curve. (*) statistically significant differences paired t-test ($p < 0.05$).

Table 4. Non compartmental pharmacokinetics parameters (mean \pm SD) estimated of AFMK following after a single IV administration of melatonin solution at a dose of 0.5 mg at ZT16 and ZT4, after transdermal administration (TD) of 10 mg of melatonin at ZT16 and ZT4 and after an oral administration of 10 mg of melatonin at ZT16.

Parameter	IV ZT16	IV ZT4	TD ZT16	TD ZT4	ORAL
	Mean \pm SD	Mean \pm SD	Mean \pm SD	Mean \pm SD	ZT16 Mean \pm SD
$t_{1/2 \lambda_z}$ (h)	0.71 \pm 0.30	0.36 \pm 0.20	2.29 \pm 1.21	2.87 \pm 2.45	0.53 \pm 0.26
C_{\max}/D (ng/mL \cdot mg)	30.90 \pm 37.28	15.23 \pm 9.60	3.88 \pm 1.67	2.84 \pm 1.16	1.68 \pm 1.33
AUC_0^∞/D (h \cdot ng/mL \cdot mg)	17.55 \pm 15.52	9.92 \pm 5.17	12.45 \pm 5.92	9.68 \pm 1.87	2.72 \pm 2.29
MRT (h)	0.77 \pm 0.14	0.65 \pm 0.23	3.72 \pm 1.39	4.08 \pm 1.82	1.43 \pm 0.24

$t_{1/2 \lambda_z}$ = elimination half-life; AUC/D = area under the concentration-time curve normalized by dose; MRT = mean residence time; C_{\max}/D = maximum concentration normalized by dose; t_{\max} = time to maximum concentration; $n = 5$ rats for all groups except for oral ZT16, where $n = 4$ rats.

FIGURES

Figure 1. LC/MS/MS ionogramme for melatonin and AFMK: (a) melatonin standard, (b) melatonin sample, (c) AFMK standard and (d) AFMK sample

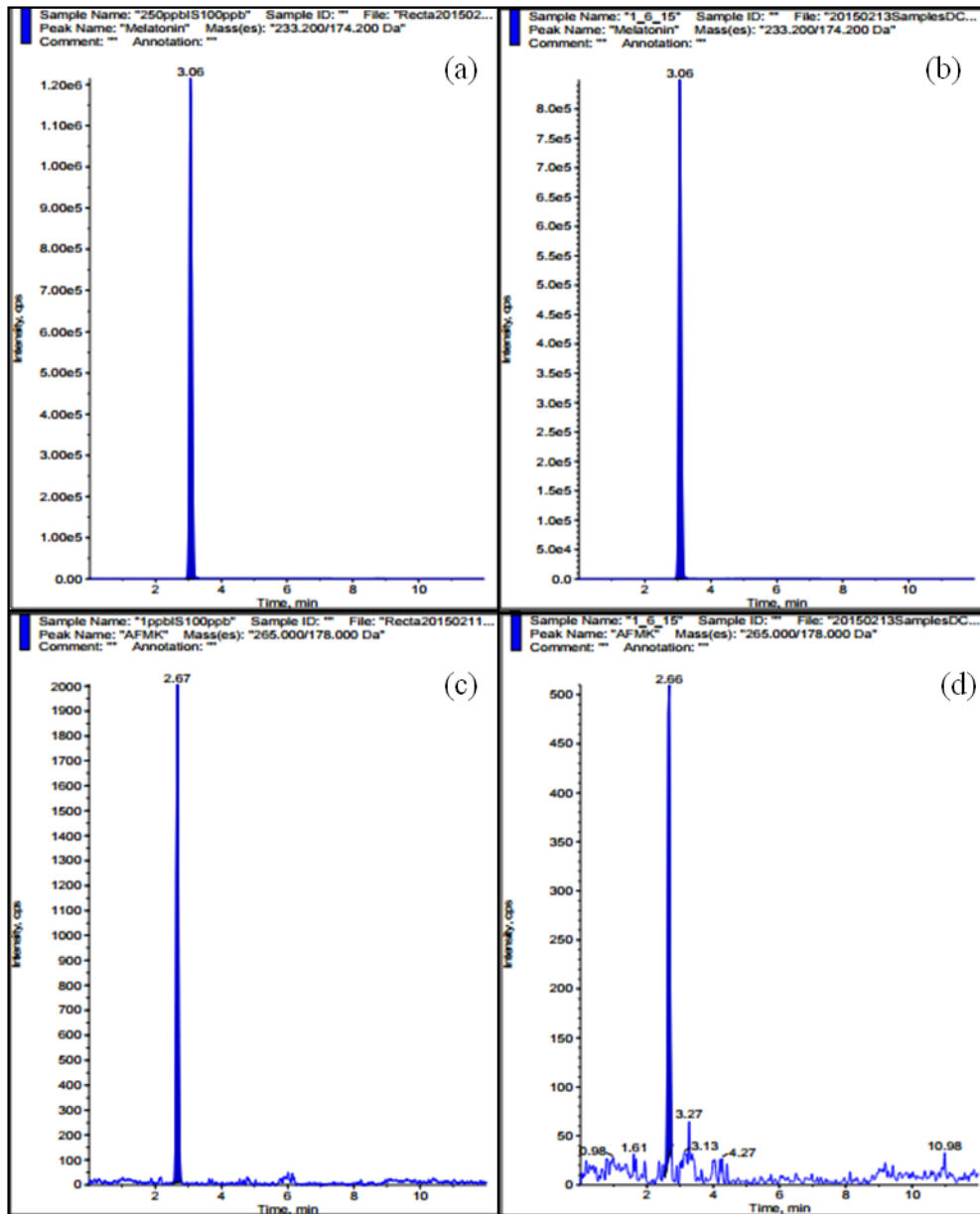


Figure 2. Melatonin plasma concentrations obtained from the different routes of administration. Melatonin concentration in plasma (ng/mL) versus time (min) expressed by mean kinetic curve with its SD: (a) IV route ZT4 fitted to a two-compartment model, (b) IV route ZT16 fitted to a two-compartment model, (c) Transdermal route ZT4, (d) Transdermal route ZT16 and (e) Oral route ZT16.

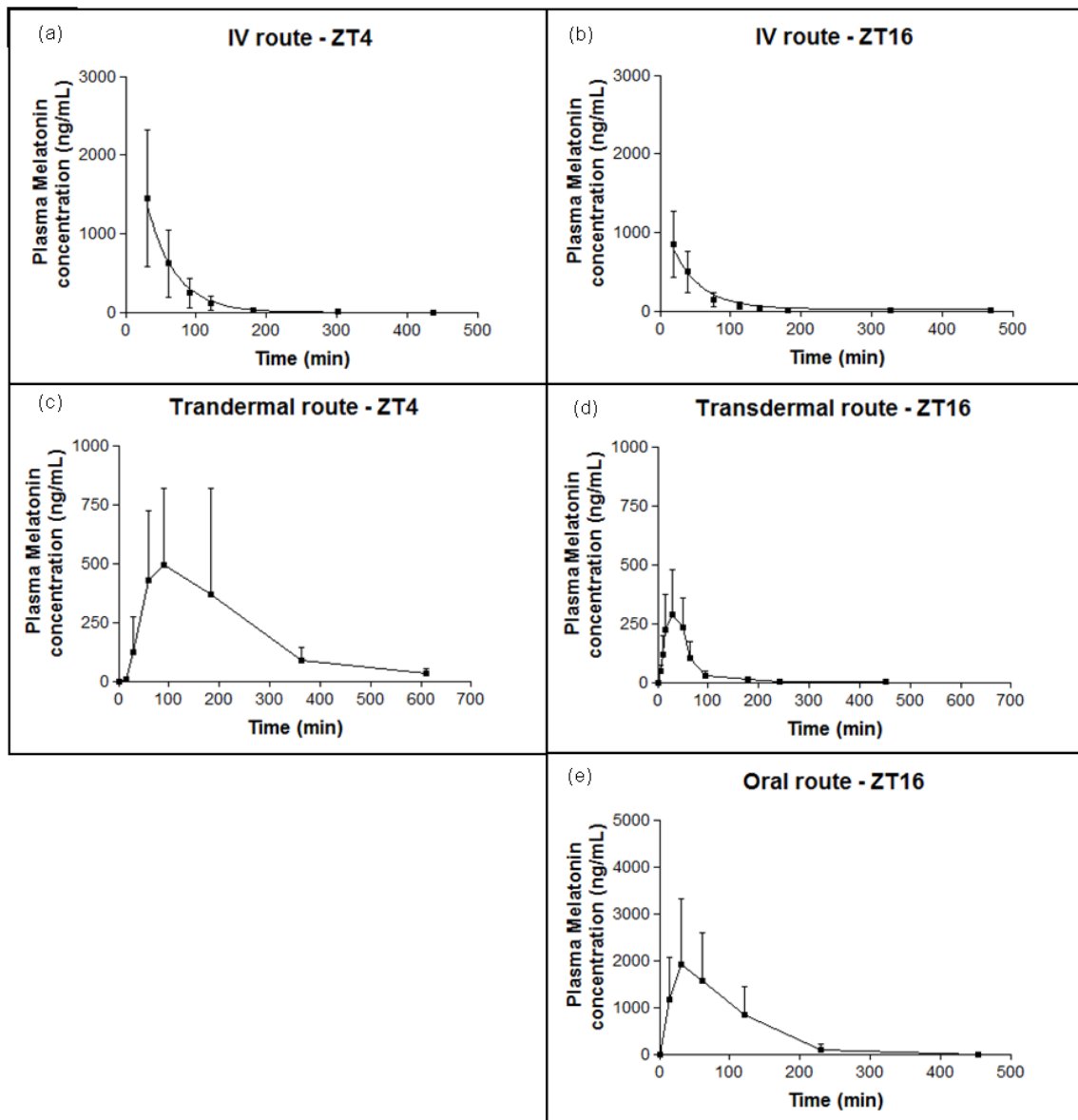
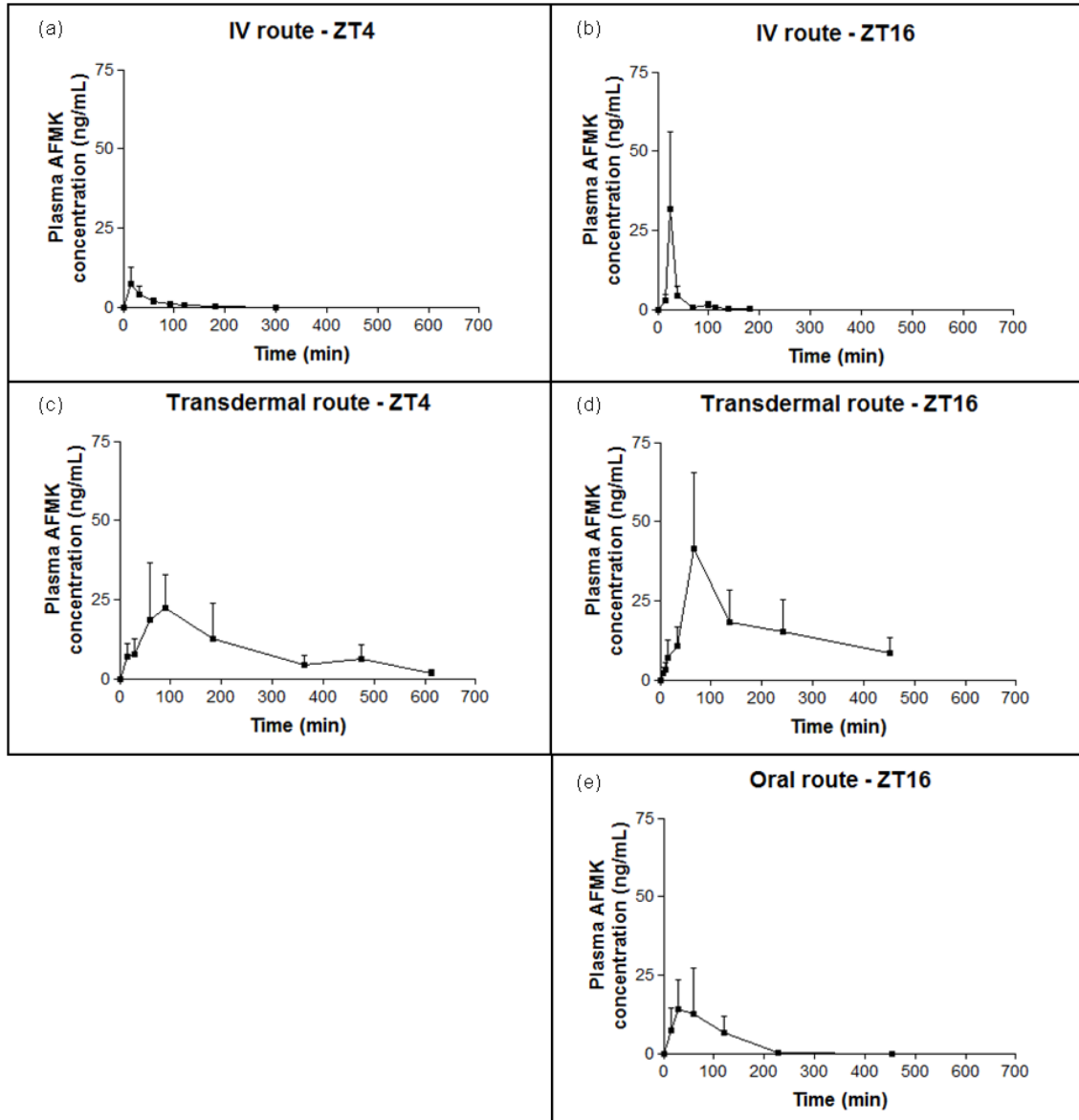


Figure 3. AFMK plasma concentrations obtained from the different routes of administration. AFMK concentration in plasma (ng/mL) versus time (min) expressed by mean kinetic curve with its SD: (a) IV route ZT4, (b) IV route ZT16, (c) Transdermal route ZT4, (d) Transdermal route ZT16 and (e) Oral route ZT16.



Artículo 5

**CIRCADIAN VARIATION OF UV-INDUCED ERYTHEMA AND THE
ACTION OF SOLAR FILTERS**

*(Variación circadiana del eritema inducido por UV y la acción de los filtros
solares)*

**Ana Flo, Ana C. Calpena, Antoni Díez-Noguera, Alfons del Pozo,
Trinitat Cambras**

Artículo sometido a publicación

Resumen

Objetivo: Los rayos UV afectan a la epidermis de los mamíferos, lo que justifica la investigación de filtros solares como forma de evitar posibles daños en la piel. Además, la sensibilidad de la piel muestra variaciones circadianas, que pueden estar influidas por los niveles de melatonina endógena. Todos estos factores pueden interferir en la detección de la eficacia de los filtros. En este estudio se analizó el eritema inducido por UV en ratas *Hairless* en dos momentos del día (en mitad de la fase de luz y en mitad de la fase de oscuridad).

Métodos: Se utilizó la emulsión MMIX, con o sin MLT. La radiación UV aplicada fue una mezcla de UVA, UVB y UVB, para simular las acciones eritematosas de la radiación solar. El eritema en la piel se midió antes y después de la exposición a la irradiación usando el *Colorimeter*[®] *CL400*, un método colorimétrico que proporciona los valores triestímulo, y se obtuvieron los valores de eritema según 3 modelos de colores: CIELAB, valor a*; RGB, valor R y xyz, valor x.

Resultados: Los resultados indicaron que el valor de a* fue el más útil para evaluar el eritema. Sin embargo, bajo la intensidad UV utilizada, el eritema sólo fue detectado cuando la irradiación se aplicó durante la fase de actividad del animal, que fue el momento en que la acción del filtro solar se pudo demostrar.

Conclusión: Las variaciones diarias en la sensibilidad de la piel se deben tener en cuenta en la investigación dermatológica ya que, como se ha comprobado en este estudio, el comportamiento de la piel en función de la hora del día es distinto.

CIRCADIAN VARIATION OF UV-INDUCED ERYTHEMA AND THE ACTION OF SOLAR FILTERS

Ana Flo¹, Ana C. Calpena¹, Antoni Díez-Noguera², Alfons del Pozo¹, Trinitat Cambras²

¹Departament de Farmàcia i Tecnologia farmacèutica. Facultat de Farmàcia, Universitat de Barcelona. Av Joan XXIII s/n, 08028, Barcelona, Spain.

² Departament de Fisiologia. Facultat de Farmàcia, Universitat de Barcelona. Av Joan XXIII s/n, 08028, Barcelona, Spain.

ABSTRACT

UV rays may cause several degrees of skin damage, which makes sunscreen research necessary. Skin sensitivity shows circadian variations, which can interfere in the detection of the efficacy of the filters. Here we studied the UV-induced erythema in hairless rats at two times of the day (light and darkness) using a colorimeter method. The effect of an emulsion with solar filters, with or without melatonin was also assayed. Results indicate that the value of a* (from CIELAB L* a* b) was the most useful to evaluate the erythema. However, at the UV intensity used, erythema was only detected when irradiation was carried out during the activity phase of the animal, which was the time when the action of the sunscreen could be demonstrated. Thus, daily variations in skin sensitivity had been demonstrated and should be taken into account in dermatological research.

Introduction

Ultraviolet (UV) radiation is part of the solar spectrum that has long been known to cause adverse effects on the skin¹. Erythema induction can be used as a model to characterize the skin damage and to assess the efficacy of various agents². Erythema can be measured in humans² or in animals³. Among the latter, hairless rats are of use in dermatological research due to the easiness in handling and low cost⁴. The erythema is usually measured by means of colorimeter assays that determine the redness of the skin as an index of the UV-induced irritation. This method can be useful to measure the action of sunscreens in preventing the damage caused by UV.

Melatonin, an indolamine secreted mainly by the pineal gland at night and in other tissues such as the skin⁵, has demonstrated its efficacy as a powerful antioxidant⁶, and also several authors have described its photoprotective effects against sunburn⁶. Moreover, it is well known that skin function shows circadian rhythms⁷, which suggest that when the studies of the effectiveness of sunscreens are performed, the hour of the day at which they are administered should be considered.

Thus, the goal of this paper was to compare effect of the time of day on the inhibition of the UV-induced erythema produced by sunscreens with or without melatonin.

Report

We used six adult male Hairless Sprague-Dawley rats (Janvier, France) maintained under 12h light-12h dark cycles. Animal's procedures were approved by the Institutional Animal Care and Use Committee of the University of Barcelona.

To test the effect of the irradiation, six areas were demarcated in the skin of the ventral side of the rat. Each area received a different emulsion (with sunscreen, with sunscreen and melatonin or control). Right side areas of the rat were exposed to UV radiation while left areas were covered (Fig. 1). The procedure was designed in such a way that all the conditions were tested simultaneously in the same rat. Emulsions (Table 1) were prepared according to Flo et al.⁸. For each rat, the test was run twice: once during the activity phase, at 16HALO (16 HALO: 16 Hours After Lights On) and, two weeks later, during the rest of the animal (4HALO), according to the times of maximum and minimum values of skin temperature, hydration and transepidermal water loss in this species⁷.

For the test, each rat was anaesthetized (Ketamine/Xylazine at a dose of 40/10 mg/kg) and the color of each area was determined per triplicate by means of a colorimeter and the mean was calculated. After that, emulsions were applied in the respective areas until total absorption. Rats were covered with a material with holes corresponding to the skin experimental areas to shelter the rat from the UV radiation. Then, the rat was placed under the UV radiation lamp (Spectroline® E-series: highest peak at 254 nm, 4 W) at a distance of 5 cm, for 1.5 hours⁹. Since we studied the response of the animals twice, we took care that the intensity would not damage the skin of the rats, thus, the induced

erythema was not visible at naked eye. After UV exposure, the color of each area was measured 3 more times and the mean was obtained.

Skin color was measured by means of the skin Colorimeter[®] CL400 and it was expressed by tristimulus values: RGB (red green blue), xyz and L*a*b (CIELAB). Since erythema is mainly defined by red color, for comparisons we used the red band of each scale, this is x, a* and R values. The level of erythema was determined by the increment of each parameter after the irradiation.

An ANOVA was carried out for each variable considering as factors that determined the erythema: time of application (HALO), UV, filters, melatonin and rat. Probability level was set at $p < 0.05$ for significance in all analysis and the statistical analysis were performed with PASW[®] statistics 18.0.

We did not found differences in the skin color before UV expositions according to the time of the day. However, considering the increment values (Fig. 3), the UV-induced erythema was detected by the three studied variables only at 16HALO. Student's t test for each group of data was used to test if the increment was different from 0. The increment was only positive for the groups submitted to irradiation at 16HALO ($p < 0.05$), excepting for a* when the emulsion with sunscreen was applied.

Since rat and melatonin did not resulted significant factors (neither their interactions), a new ANOVA was carried out considering as factors the HALO, UV and filters. In this case, only for a*, HALO was a significant factor ($p < 0.05$) as well as the interactions: HALO x UV ($p < 0.01$), and filters x UV ($p < 0.05$). When each time of the day was analyzed separately, the results showed that UV only affected a* at 16HALO, the only time at which the effect of the sunscreen could be detected.

DISCUSSION

Skin color is made up of many different components including melanin (protective tanning pigment) and redness (erythema) that can vary due to environmental influences. In our experiment we did not find basal color differences according to the time of the day, but, for the same exposure time, the UV radiation had a more erythematosus effect during the active phase of the animal. It is worth to notice that even the effect on the UV irradiation could be determined by any of the three studied variables, R, x and a*, the

reversal effect of the filters was only detected using a^* , parameter that is considered to be independent on the instrument¹⁰, and when irradiation was received during the activity phase of the rat. In Hairless rats, the maximum values for skin temperature, hydration and TEWL, occurred at the second half of the night⁷, therefore these factors might have a role in the skin sensitivity to UVR. Thus, the time of the day is an important factor when the damaging effects of UV radiations are being determined.

LEARNING POINTS:

- For the same UV intensity, erythema is more prominent during the activity phase in hairless rats.
- Although variables a^* , R and x are all useful to measure erythema, a^* has resulted the most useful for the research of the effects of the filters.
- Although melatonin has antioxidant effects, it had no extra effect on the reduction of the erythema when added to the filters.
- Circadian variations of skin should be taken into account when testing the effects of drugs to prevent UV-induced erythema.

REFERENCES

1. Correa M de P. Solar ultraviolet radiation: properties, characteristics and amounts observed in Brazil and South America. *An. Bras. Dermatol.* 2015;**90**(3):297-313.
2. Matias AR, Ferreira M, Costa P, Neto P. Skin colour, skin redness and melanin biometric measurements: comparison study between Antera((R)) 3D, Mexameter((R)) and Colorimeter((R)). *Skin Res. Technol.* 2015;**21**(3):346-362.
3. Yel M, Güven T, Türker H. Effects of ultraviolet radiation on the stratum corneum of skin in mole rats. *J. Radiat. Res. Appl. Sci.* 2014;**7**(4):506-511.
4. Jung EC, Maibach HI. Animal Models for Percutaneous Absorption. In: Shah VP, Maibach HI, Jenner J, eds. *Topical Drug Bioavailability, Bioequivalence, and Penetration*. Springer New York; 2014;21-40.
5. Kim T-K, Lin Z, Tidwell WJ, Li W, Slominski AT. Melatonin and its metabolites accumulate in the human epidermis in vivo and inhibit proliferation and tyrosinase activity in epidermal melanocytes in vitro. *Mol. Cell. Endocrinol.* 2015;**404**:1-8.
6. Scheuer C, Pommergaard H-C, Rosenberg J, Gögenur I. Melatonin's protective effect against UV radiation: a systematic review of clinical and experimental

- studies. *Photodermatol. Photoimmunol. Photomed.* 2014;**30**(4):180-8.
7. Flo A, Díez-Noguera A, Calpena AC, Cambras T. Circadian rhythms on skin function of hairless rats: light and thermic influences. *Exp. Dermatol.* 2014;**23**(3):214-216.
 8. Sierra AF, Ramírez MLG, Campmany ACC, Martínez AR, Naveros BC. In vivo and in vitro evaluation of the use of a newly developed melatonin loaded emulsion combined with UV filters as a protective agent against skin irradiation. *J. Dermatol. Sci.* 2013;**69**(3):202-14.
 9. Park YK, Gange RW, Levins PC, Parrish JA. Low and moderate irradiances of UVB and UVC irradiation are equally erythemogenic in human skin. *Photochem. Photobiol.* 1984;**40**(5):667-669.
 10. Kim C-S, Kim MK, Jung B, et al. Determination of an optimized conversion matrix for device independent skin color image analysis. *Lasers Surg. Med.* 2005;**37**(2):138-143.

TABLE

Phase	Components	Emulsion with filters Concentration (%)	Emulsion with filters and melatonin Concentration (%)
A	Melatonin	-	2%
	Octyl salicylate	5%	5%
B	Octyl methoxycinnamate	5%	5%
	Benzophenone-3	5%	5%
	Medium chain triglycerides	5%	5%
	Perhydroesqualene	5%	5%
	Montanov® 68	5%	5%
C	q.s. water	100%	100%

Table 1. Quantitative composition of the formulation

FIGURES

Figure 1: Skin areas. Each area received a different treatment: (1) sunscreen + melatonin – exposed to UV radiation, (2) sunscreen– exposed to UV radiation, (3) control – exposed to UV radiation (4) sunscreen + melatonin – not exposed to UV radiation, (5) sunscreen– not exposed to UV radiation, and (6) control – not exposed to UV radiation.

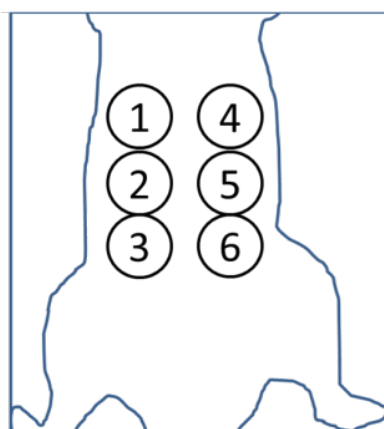
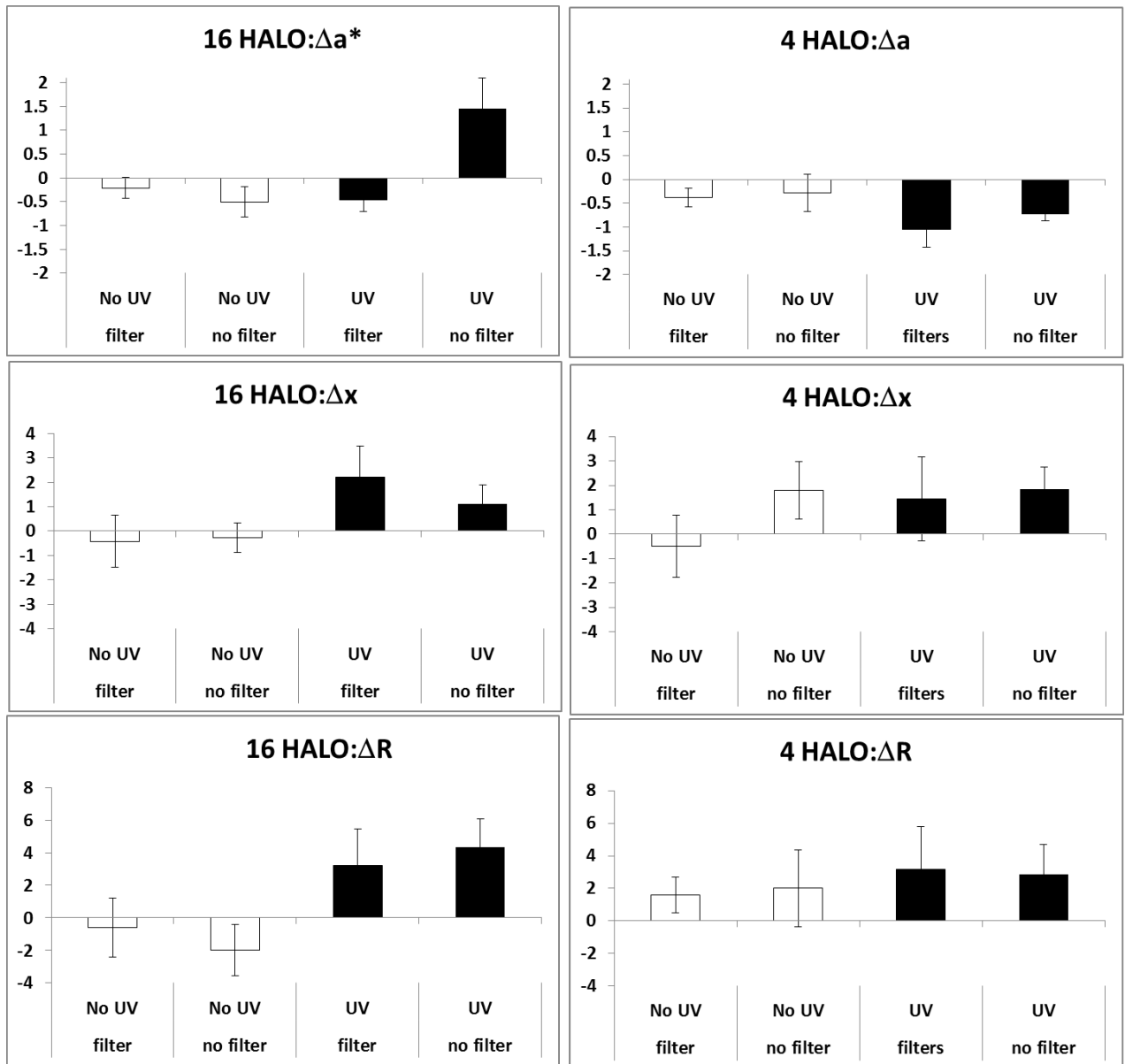


Figure 2: Increment of a^* , R and x variables after the UV irradiation (after-before).



CAPÍTULO IV. DISCUSIÓN

El objetivo de la presente tesis doctoral ha sido el estudio de la influencia de los ritmos circadianos de la piel en la farmacocinética de la MLT administrada exógenamente por vía transdérmica. Para lograr el objetivo planteado, la tesis doctoral se ha estructurado en 3 fases. La primera fase, cuyos resultados han sido recopilados en los **Artículos 1 y 2**, ha consistido en la elaboración de formulaciones de MLT al 1% que han sido caracterizadas reológica y físicamente y a las que se las ha sometido a un estudio *in vitro/ex vivo* de liberación y permeación de MLT, en membrana y piel humana respectivamente, así como a la determinación de la cantidad de MLT retenida en la piel. La formulación escogida ha sido aquella que mejores perfiles de liberación y permeación de MLT ha presentado, junto con mayores retenciones en piel y un buen perfil reológico. Para esta formulación, que podría tener potenciales acciones reguladores de los ritmos de sueño, se han elaborado variantes con filtros solares que serían más adecuadas para su aplicación en presencia de radiaciones UV y otras circunstancias en las que es necesaria una acción de la MLT como antioxidante en la piel.

La segunda fase se ha basado en la caracterización de los ritmos funcionales de la piel, en concreto de los ritmos de hidratación de la piel, temperatura cutánea y pérdida de agua transepidérmica en un modelo animal seleccionado, la rata *Hairless*, apto para uso dermatológico en distintas condiciones lumínicas y ambientales con el fin de simular circunstancias que pueden provocar la pérdida o atenuación de los ritmos circadianos (ancianos, trabajo por turnos, vuelos transmeridianos u otros), y comprobar si la alteración de estos ritmos tiene consecuencias en las propiedades de la piel y sus ritmos funcionales, los resultados de este estudio se encuentran recogidos en el **Artículo 3**.

La tercera fase de esta tesis doctoral ha consistido en el uso de las formulaciones óptimas descritas en los **Artículos 1 y 2** aplicadas en la piel de rata *Hairless in vivo* teniendo en cuenta los ritmos circadianos referidos en el **Artículo 3** en condiciones de LD y temperatura constante. De esta forma, en el **Artículo 4** recoge el estudio de la influencia de los ritmos de la piel en la absorción de la MLT aplicada por vía transdérmica a partir de la emulsión M68 y como en función de la hora del día, los procesos de distribución, metabolismo y excreción influyen también en la cinética de la MLT. En el **Artículo 5**, la emulsión MMIX se ha utilizado para evaluar como los ritmos de la piel influyen en los efectos de la radiación UV y la eficacia de ésta para evitar el eritema provocado por la radiación.

Fase 1. Desarrollo de formulaciones de aplicación dérmica y transdérmica con MLT

En primer lugar, antes de empezar con la elaboración de las formulaciones, se realizó la validación de la metodología analítica para la cuantificación de la MLT en HPLC. La linealidad, exactitud y precisión se evaluaron y demostraron siguiendo las directrices internacionales.

Según se detalla en el **Artículo 1**, para seleccionar la formulación óptima para el estudio cronofarmacocinético de MLT se elaboraron 4 formulaciones con características y naturalezas distintas, adecuadas para el uso en la piel, y se estudió su comportamiento *in vitro* y *ex vivo*. A todas ellas se les añadió un 1% de MLT.

Los vehículos seleccionados para el estudio fueron el hidrogel *C940*, que es un polímero de ácido acrílico que se hincha en presencia de agua, incrementando su volumen original hasta en 1000 veces y en 10 veces su diámetro. Cuando se expone a un pH por encima de 6 forma un gel. Las dispersiones poliméricas acuosas son muy útiles como plataformas de administración de fármacos, ya que pueden resistir el estrés fisiológico causado por la flexión de la piel, el parpadeo y el movimiento mucociliar, adoptando la forma de la zona de aplicación y pudiendo liberar el fármaco de forma controlada (Yonese 2001). La emulsión o/w (*M68*), en la que el Montanov[®] 68 es el agente tensioactivo, los MCT y el PHE son los componentes de la fase oleosa, y el agua forma la fase acuosa. El Montanov[®] 68 es un tensioactivo no iónico que da lugar a una estructura de cristal líquido liotrópico laminar con birrefringencia negativa, con predominancia de gel, por lo que las bicapas se presentan de forma ordenada y rígida. Esta estructura laminar presenta grandes ventajas, como la mejora de la hidratación de la piel, ya que limita la pérdida de agua transepidérmica, con lo que favorece la permeación de fármacos, modula la liberación y permeación de los principios activos y previene la deshidratación de la epidermis.

Los 2 últimos vehículos estudiados fueron el *P407* y el *PLO*, ambos del grupo de los poloxámeros, que son polímeros formados por bloques de polioxietileno-polioxipropileno-polioxietileno termosensibles que forman geles mucoadhesivos a la temperatura corporal.

El pH de todas las formulaciones resultó ser ligeramente ácido, lo que las hacía aptas para la aplicación cutánea, puesto que el pH de la piel varía entre 4 y 6, dependiendo del área de la piel y la edad del individuo.

Debido a que el conocimiento de las propiedades reológicas y mecánicas de las formulaciones tiene una gran importancia, ya que dan una idea de su comportamiento cuando se aplican sobre la piel, se procedió a su estudio en las 4 formulaciones. Se demostró que todas las formulaciones tenían un comportamiento no newtoniano, lo que significa que cuando la velocidad de cizalla aumenta, los valores de viscosidad disminuyen. Bajo la influencia de la cizalladura, las moléculas tienden a desenmarañarse y alinearse en la dirección del flujo ofreciendo menos resistencia. La presencia de histéresis o tixotropía en todas las fórmulas demostró que eran pseudoplásticas. Los materiales pseudoplásticos pueden romperse para facilitar su extensión y la película aplicada puede ganar viscosidad instantánea para evitar que se escurran, por lo tanto, a priori todas las formulaciones eran adecuadas.

En todas las formulaciones excepto en el PLO, el modelo que mejor se ajustó a los datos experimentales fue la ecuación de Cross, con un alto grado de precisión tanto en el tramo ascendente como en el descendente. En cambio, la fórmula de PLO se ajustó mejor a la ecuación de Herschel-Bulkley, que describe el comportamiento de sistemas más complejos (Bonn & Denn 2009).

Todas las formulaciones demostraron estabilidad física, no mostrando macroscópicamente ningún signo de inestabilidad cuando se mantuvieron a temperatura ambiente durante 12 meses ni cuando se sometieron a condiciones extremas.

Para evaluar si existían diferencias en el patrón de liberación de MLT, se llevó a cabo un estudio de liberación con membranas de polisulfona. Este estudio demostró que la formulación que permitía una mayor liberación de MLT fue el M68, con un 79% ($\pm 16\%$), seguida del C940. Al ser la formulación M68 un sistema de emulsión, la mayor liberación observada en comparación con el resto de formulaciones apoyaría la hipótesis de que las mayores áreas interfaciales presentes en las emulsiones formadas por gotas pequeñas pueden promover la liberación rápida de fármacos poco solubles (Nielsen et al. 2008).

Los datos experimentales obtenidos del estudio de liberación de MLT se ajustaron a distintas ecuaciones empíricas. El M68, el C940 y el PLO se ajustaron a un modelo de orden uno. Según este modelo la MLT se liberaría a una velocidad proporcional al gradiente de concentración, lo que provoca la difusión de los fármacos. Este modelo está basado en la primera ley de Fick, según la cual las cantidades liberadas son directamente

proporcionales a las cantidades remanentes en formulación. En cambio, el P407 se ajustó a la ecuación de Weibull. En ella, el valor β de la ecuación, que ha sido considerada típicamente empírica, se ha propuesto como indicador del mecanismo de la liberación por difusión. En este estudio, el resultado de β obtenido indicó que la MLT difunde según un mecanismo complejo que combina la difusión de Fick con una liberación controlada basada en el hinchamiento de la estructura polimérica (Papadopoulou et al. 2006).

Por último, para discernir cuál de las formulaciones era la óptima para los estudios de cronofarmacocinética y de irradiación, se llevó a cabo el estudio de permeación *ex vivo* con piel humana. Las tasas más altas de permeación se obtuvieron con las formulaciones de C940 y M68, mientras que P407 y PLO mostraron tasas de permeación muy bajas. Entre C940 y M68 no se encontraron diferencias estadísticamente significativas y en ambos casos las concentraciones plasmáticas teóricas en estado de equilibrio estacionario estarían por encima de la concentración mínima terapéutica para regular el ritmo de sueño (Agency 2014). La determinación de las concentraciones de MLT retenidas en la piel demostró que las pieles tratadas con las formulaciones de M68 y P407 fueron las que más cantidad de MLT contenían, habiendo diferencias estadísticamente significativas entre M68 vs C940 y M68 vs PLO ($p < 0,05$).

En base a los resultados anteriores, la formulación base seleccionada para los estudios posteriores fue la emulsión M68 que contenía Montanov[®] 68, MCT, PHE y agua, ya que presentó los mayores niveles de liberación de MLT y la mayor cantidad de esta sustancia retenida en piel y además mostró un perfil de permeación adecuado para los estudios posteriores.

Una vez seleccionado el vehículo, se procedió a añadir a la misma base, diversos filtros solares, solos y en combinación, para disponer de una formulación que no sólo contuviera MLT sino que incluyera también filtros solares para que pudiera ser utilizada en el caso de presencia de radiación UV u otros tipos de radiación para los que los filtros solares usados fueran efectivos, datos que se recogen en el **Artículo 2**.

Los filtros solares seleccionados fueron el OS, el OMC y la 3Bph por ser de uso habitual en las cremas solares. Estos se añadieron a la fase oleosa a una concentración del 5% cada filtro, dando lugar a 4 emulsiones nuevas, MOS, MOMC, MBph y MMIX. Su adición no

modificó el pH de las formulaciones, que se mantuvieron ligeramente ácidas y por tanto adecuadas para la aplicación cutánea (Loden 2003).

La caracterización reológica de las emulsiones resultantes se llevó a cabo con el fin de evaluar si la adición de los filtros UV inducía cambios en el comportamiento. Las formulaciones MOS, MOMC y M3Bph, mostraron valores de viscosidad similares a la emulsión M68 pero, en el caso de la emulsión MMIX, las viscosidades fueron estadísticamente mayores.

La clasificación reológica fue la misma en todas las formulaciones y equivalentes a la formulación M68, siendo fluidos pseudoplásticos no newtonianos, con comportamiento tixotrópico. Como ya se ha comentado, este es el comportamiento deseable para las formulaciones cutáneas y de protección solar ya que producen una película protectora sobre la superficie de la piel.

En cuanto a la tixotropía, la presencia de un sólo filtro no la alteró, sin embargo, la adición de los tres filtros indujo un valor de tixotropía estadísticamente menor que en el resto de emulsiones. Para las formulaciones de protección solar es importante tener un valor óptimo de tixotropía, ya que valores muy bajos, hacen que la capacidad de extensión sea insuficiente para permitir una buena distribución de la protección solar. Y por encima de la tixotropía óptima, una vez aplicado el producto, continúa fluyendo y por lo tanto no es posible su distribución uniforme (Loden 2003). Así, las formulaciones ideales serían aquellos que presentan una tixotropía baja como es el caso de la formulación MMIX. Estos resultados están de acuerdo con lo señalado por Gaspar y Maia Campos (Gaspar & Maia Campos 2003).

En este caso, el ajuste a un modelo se realizó únicamente para la emulsión MMIX. El modelo escogido fue Ostwald-De-Waele, ya que fue el que obtuvo mejores valores de r^2 y chi-cuadrado y un buen ajuste a los reogramas experimentales. Este modelo es el más adecuado según otros autores para ajustar los datos experimentales de emulsiones de aceite en agua (Nikovska 2010).

Los estudios de liberación de MLT de las emulsiones con filtros solares llevados a cabo con la membrana de polisulfona mostraron un proceso en dos fases. La fase inicial mostró una liberación por erosión que se puede atribuir a la MLT que hay en la superficie de la

emulsión, seguida por una fase de liberación sostenida más lenta para todas las emulsiones. El fenómeno exhibió que la liberación de MLT está controlada por difusión. A pesar de la falta de diferencias estadísticas ($p > 0,05$) entre las emulsiones ensayadas, hay una tendencia de mejora en la liberación de MLT a partir de emulsiones que incorporan uno o tres filtros UV a partir de 5 min hasta la segunda hora del experimento, posiblemente debido a un cambio en la actividad termodinámica de la MLT debido al aumento de la lipofilia de la formulación.

Como la emulsión M68, el resto siguieron un modelo de orden uno, en el cual la MLT se liberó a una velocidad proporcional al gradiente de concentración que conduce a la transferencia de ésta.

La descripción matemática del proceso de liberación de un fármaco es complicada debido al número de características físicas que se deben tomar en consideración. Entre los factores involucrados, en nuestro caso se estudió la existencia de una correlación entre la viscosidad y el valor de la constante de liberación, observándose una buena correlación hiperbólica entre ambas con un valor de r^2 de 0,9768 en tres de las cinco formulaciones ensayadas.

Los ensayos de permeación de las emulsiones mostraron una relación casi lineal entre las cantidades acumulativas de fármaco permeado frente al tiempo, indicando que se mantuvo el estado de equilibrio estacionario y que la cantidad retenida en el estrato córneo fue constante. Además, la evaluación del potencial irritante de los vehículos se midió usando el parámetro TEWL que permite observar cambios en la integridad de la piel en su función como barrera (Fang et al. 2003). Su determinación antes y después de los estudios, confirmó que las membranas de piel humana estaban intactas.

El tiempo de latencia, el coeficiente de permeabilidad, el flujo, el coeficiente de reparto, la constante de difusión y la relación sinérgica de la MLT se calculó a partir de las cantidades acumulativas que habían permeado a través de la piel en función del tiempo en condiciones de estado estacionario. El análisis no paramétrico de los datos experimentales se realizó en este estudio y el perfil medio de cantidades de MLT permeadas en función del tiempo tras la aplicación de la emulsión MMIX fue mayor que en el resto de emulsiones.

Llegados a este punto, intentó correlacionarse los niveles de MLT permeados con las características reológicas, observándose que las muestras con características reológicas

similares tenían flujos y coeficientes de permeación comparables. Al relacionar los resultados de permeación con los hallazgos reológicos, se apreció que pequeñas diferencias en los perfiles reológicos no tenían una influencia decisiva sobre la permeación de la MLT. Sin embargo, los menores valores de viscosidad encontrados para la emulsión MMIX se acompañó de un flujo y un coeficiente de permeación más elevados y una mayor cantidad de MLT permeada. Esto coincide con la capacidad que poseen las formulaciones de baja viscosidad para aumentar el flujo y el coeficiente de permeabilidad (Savic et al. 2007), aunque normalmente sean necesarias diferencias de viscosidad de un orden de magnitud para detectar cambios importantes, es posible que diferencias menores puedan modificar el perfil de permeación de los fármacos.

Por otro lado, teniendo en cuenta los valores de la constante de difusión, la emulsión MMIX exhibió el valor más bajo después de 24 h, por lo tanto, las diferencias en la permeabilidad dérmica podrían explicarse por el mayor valor del parámetro P1, que está directamente relacionado con el coeficiente de reparto entre la membrana y la fase donadora, y el menor valor del parámetro P2, directamente relacionado con el coeficiente de difusión.

Estos hallazgos implican que la tasa de la MLT permeada a partir del sistema de emulsión es un parámetro complejo que no se puede correlacionar simplemente con la disminución de la viscosidad. Un estudio de los efectos de una serie de vehículos lipófilos utilizando calorimetría diferencial de barrido y capas aisladas del estrato córneo mostró que los MCT no alteraban las temperaturas de transición de fase ni las entalpías de los lípidos del estrato córneo, lo que explica la falta de efecto de los MCT como promotores de la permeación *in vivo* (Leopold & Lippold 1995). Se hipotetiza, de acuerdo con nuestros resultados que el Montanov[®] 68 puede interactuar de forma diferente dependiendo de la composición del vehículo y la disposición de éste dentro de la formulación, ya que como han descrito otros autores, este tensioactivo que presenta una estructura de cristal líquido laminar, mayoritariamente de láminas en fase de gel, puede presentarse como capas planas, terrazas o escalones en este tipo de emulsiones (Makai et al. 2003). De acuerdo con Savic' et al. (Savic et al. 2007), en el Montanov[®] 68 las capas laminares están presumiblemente hechas de bicapas de cristales mixtos, la mayor parte de glucósido cetearílico que se distribuyen al azar entre las partes de las moléculas de alcohol cetearílico. Además, se espera que las inserciones de las cadenas alquilo de los tres filtros usados en MMIX tengan formas de empaquetarse diferentes dentro de las láminas formadas. Como el PHE es un aceite no

polar, y los MCT se distinguen por sus grupos polares, diferentes tipos de fuerzas pueden estar involucrados en sus respectivas interacciones con el tensioactivo y el agua, probablemente afectando al comportamiento reológico y a las propiedades termodinámicas de la MLT contenida dentro de los sistemas.

Además, el mayor flujo obtenido para la emulsión MMIX podría explicarse por las propiedades sinérgicas de los tres filtros UV. Debido al carácter lipófilo de los tres filtros, éstas podrían interactuar con la membrana lipídica para facilitar la penetración de la MLT. Así la condición de mayor flujo se vería favorecida por la combinación de los tres filtros en la emulsión MMIX. Igualmente la emulsión MMIX mostró un índice de permeación sinérgico más alto que el resto de emulsiones. La hipótesis es que la actividad termodinámica de la emulsión es un motor importante para la liberación del fármaco y su penetración en la piel, por lo que MMIX al contener tres filtros UV tendrían una actividad termodinámica más alta y por consiguiente una mayor tasa de permeación de MLT.

En los estudios *ex vivo*, los períodos de latencia fueron largos, lo que sugiere un proceso de permeación moderado. Es importante remarcar que en los estudios *ex vivo*, las formulaciones se aplican en la piel pero no se favorece mecánicamente su penetración, por lo que el proceso para que toda la cantidad de MLT penetre en la piel es mucho más lento que en los estudios *in vivo*, en los que se ayuda a la penetración del fármaco.

La cantidad de MLT que quedó retenida en la piel después de 24 h de tratamiento con la emulsión MMIX fue notable y mayor que en el resto de emulsiones, lo que significa que esta emulsión tiene un efecto de depósito en el estrato córneo. En consecuencia, se puede esperar una acción local sostenida de MLT.

En base a los resultados anteriores, la emulsión MMIX sería adecuada para ejercer su acción a nivel local como antioxidante y también a nivel sistémico es la formulación más adecuada ya que proporciona el mayor flujo de permeación de MLT y es con la que se obtienen mayores cantidades retenidas en la piel. No obstante, debido a que el uso de filtros sólo se recomienda en presencia de radiación UV, esta emulsión sólo fue aplicada *in vivo* en los estudios de irradiación del **Artículo 5**.

Los efectos secundarios producidos por agentes oxidantes, tales como las radiaciones UV o γ , se pueden prevenir por la acción de la MLT en concentraciones de 10^{-3} a 10^{-6} M

(Fischer et al. 2008), concentraciones que se alcanzarían usando la emulsión MMIX de acuerdo con nuestros resultados *ex vivo*. Esta estrategia de potenciar el efecto fotoprotector de filtros UV con sustancias antioxidantes se ha estudiado previamente mediante el uso de tocoferol y otros agentes antioxidantes, pero no con MLT con la ventaja de que dosis bajas ya son suficientes para ejercer la acción. De hecho, la MLT, tiene un potencial de reducción más alto que la vitamina C o el trolox.

Los efectos antioxidantes de la MLT se producen por al menos dos mecanismos. En primer lugar, la MLT en sí misma ejerce efectos antioxidantes directos a través de captación de radicales libres y/o mediante la inhibición de su generación. Adicionalmente, la MLT altera las actividades de las enzimas, mejorando la capacidad de defensa antioxidante endógena de los organismos. Por ejemplo, la formación de los factores de transcripción redox-sensibles, como el factor nuclear NFkB, generados por ROS es un evento central y temprano en la inducción de reacciones inflamatorias (Fuchs et al. 2001). El NFkB es un factor sensible al estrés oxidativo que activa múltiples genes diana implicados en la expresión de varios mediadores proinflamatorios.

Para determinar si las formulaciones tendrían capacidad antioxidante real, se evaluó la capacidad de los componentes per se y de las emulsiones para captar el radical DPPH % a tiempo 0 y 12 meses, en presencia y ausencia de luz. Los resultados mostraron una clara capacidad antioxidante intrínseca de la MLT per se. Los filtros por sí solos mostraron capacidad antioxidante pero muy reducida en comparación con la MLT. En cambio los excipientes de la formulación no mostraron capacidad antioxidante, por lo tanto se consideró que estos componentes no participan en las propiedades antioxidantes observadas en el resto de muestras analizadas.

Se observó que la emulsión base M68 sin MLT producía un aumento en el % de radical DPPH, lo que le otorga una acción oxidante. No obstante, al añadir la MLT, pese a reducir la acción antioxidante de ésta, la formulación obtenida poseía actividad antioxidante. Respecto a los filtros solares, su incorporación promovió la transferencia de electrones para reducir el radical DPPH. En presencia de luz, la emulsión con OS, incrementó la capacidad de reducir el DPPH, en cambio el filtro 3Bph mostró el comportamiento contrario, lo que podría ser debido a que el 3Bph es más inestable y podría inducir una mayor producción de ROS en presencia de luz (Hanson et al. 2006).

Al observar la evolución de la reducción del radical DPPH en función del tiempo y el comportamiento de los filtros *per se*, se hipotetiza que en la emulsión con los 3 filtros pero sin MLT, los primeros 25 minutos el OMC es el responsable de de la actividad antioxidante y después ésta es mantenida por el OS y la 3Bph hasta los 120 minutos. El mismo razonamiento se podría usar para la formulación con MLT, que aumentaría el valor de la actividad antioxidante desde tiempo 0 hasta 120 minutos.

A pesar de los excelentes resultados, no está claro si los efectos descritos son el resultado de la acción directa de la MLT o productos de su metabolismo. La MLT, también se sintetiza y metaboliza en la piel y este metabolismo implica vías indólicas y quinúricas (Slominski et al. 2008). Varios autores han identificado efectos protectores de los productos de degradación de MLT inducidos por la radiación UV, tales como el AFMK y el AMK, que se han clasificado como antioxidantes y antiinflamatorios (Fischer et al. 2006).

A fin de aclarar esta controversia, se evaluó el efecto de la exposición UV en el metabolismo. La irradiación de las emulsiones con luz UV provocó otros compuestos detectados por HPLC. Esta observación es importante, porque algunos de los efectos protectores de la formulación MMIX podrían ser compartidos por sus metabolitos. Por este motivo, en los estudios de cronofarmacocinética se decidió añadir el análisis de este metabolito adicionalmente al análisis de MLT en el **Artículo 4**.

Después de 12 meses los resultados de RSA (%) mostraron que el porcentaje medio de reducción del DPPH de la muestra MMIX almacenada durante 12 meses seguía teniendo valores altos de % de reducción del DPPH, siendo más alto que el obtenido por las otras 4 emulsiones a tiempo 0. Así, estos resultados evidenciaron que la emulsión MMIX era la que poseía mayor actividad antioxidante y era capaz de mantener la actividad de eliminación de radicales libres hasta mínimo 12 meses.

Las 5 emulsiones demostraron no ser irritantes y tener capacidad protectora contra la radiación UV, siendo la emulsión MMIX la única que conseguía igualar los valores de las áreas no irradiadas. De esta manera MMIX fue la formulación que mostró los mejores resultados en el ensayo fotoprotector y por tanto fue la seleccionada para el estudio de irradiación en rata *Hairless*.

Una vez definido que la emulsión M68 y MMIX reunían las características necesarias ex vivo para ser utilizadas en el ensayo in vivo, se definió que la formulación M68 sería utilizada para el estudio de cronofarmacocinética, en el que el objetivo era estudiar las diferencias cinéticas entre aplicar la formulación a dos horas del día distintas y que podría ser de utilidad para la regulación del ritmo de sueño, o para el *jet-lag* o los desajustes en los casos de trabajo por turnos. La formulación MMIX se utilizaría para evaluar en un ensayo in vivo si existían diferencias en la eficacia de los filtros solares en función de la hora del día a la que se administraban y esta emulsión sería de utilidad en el caso de aplicarse por las acciones antioxidantes de la MLT, sus metabolitos y los filtros solares.

Fase 2. Selección del modelo animal y caracterización de los ritmos funcionales de la piel

Una vez definidas las formulaciones, se procedió a la caracterización de los ritmos de la piel en una especie animal que se usaría como modelo según se detalla en el **Artículo 3**. La selección de la especie se realizó tras una extensa revisión bibliográfica en las que se identificaron todas aquellas especies animales aptas para estudios de absorción transdérmica. Los animales que se usan en los estudios de absorción transdérmica son el mono (macaco Rhesus y mono ardilla), el cerdo, el conejo, el conejillo de indias (con pelo y la variante *Hairless*), la rata (con pelo y la variante *Hairless*), el ratón *Hairless* y el perro *Hairless* (Jung & Maibach 2014). De entre todos ellos, las especies con la piel más parecida a la humana son el mono, el cerdo y el perro, pero, se descartó su uso por la necesidad de conseguir un modelo animal de fácil obtención, manipulación y de pequeño tamaño para su alojamiento en cabinas de control cronobiológico.

A continuación, debido a la necesidad de realizar estudios de caracterización de los ritmos de la piel y posteriormente de absorción transdérmica, se descartó a las especies con pelo ya que la necesidad de depilar al animal previamente podía alterar los resultados de los estudios de permeación debido a modificaciones de las características fisiológicas de la piel. Entre las especies *Hairless*, el ratón se descartó debido a que los estudios demuestran que la predicción con humanos es complicada (Jung & Maibach 2014) y su pequeño tamaño dificultaría los estudios de absorción. Finalmente, entre el conejillo de indias y la rata, ambos con similitudes con la piel humana pese a que presentan una mayor permeabilidad que ésta (Shah et al. 1991; Jung & Maibach 2014), se escogió la rata *Hairless* debido a la

facilidad de obtención de esta especie. No obstante, a pesar de la existencia de diferencias en la permeabilidad de la piel de la rata y la humana, esta especie ha sido ampliamente utilizada en estudios dermatológicos y cosméticos, y varios estudios han comparado las características de ambas pieles, llegándose a describir algunas ecuaciones para extrapolar los valores obtenidos en piel de rata a piel humana (Godin & Touitou 2007; Jung & Maibach 2014; van Ravenzwaay & Leibold 2004).

Los parámetros de la piel a analizar, se seleccionaron en base a la probabilidad de que su hipotética variación pudiera tener influencia en la permeación del fármaco. Las variables escogidas fueron la temperatura, que se conoce que fluctúa siguiendo un ritmo circadiano y se ha demostrado que en función de la temperatura, la bicapa lipídica se puede alterar y modificar su estructura, y por tanto la permeación de los fármacos a través de ésta (Bolzinger et al. 2012; Shahzad et al. 2015). La hidratación del estrato córneo, para la que se ha demostrado una relación directa con el porcentaje de absorción transdérmica (Ritschel & Hussain 1988), ya que incrementa las regiones acuosas de los lípidos intercelulares lo que aumenta su carácter hidrófilo. Este incremento de la absorción se observa principalmente en fármacos hidrófilos, anfífilos y de pequeño tamaño, como es el caso de la MLT. Por último, se seleccionó la pérdida de agua transepidérmica, que es una variable útil para evaluar el estado funcional de la barrera de la piel y se ha descrito su correlación con la permeación dérmica y absorción transdérmica (Levin & Maibach, 2005). Un TEWL alto sugiere que la barrera epidérmica está dañada y que la permeabilidad del fármaco aplicado por vía transdérmica puede aumentar significativamente. Para este parámetro algunos estudios han demostrado que posee fluctuaciones circadianas (Berthaud & Boncheva 2011; Yosipovitch et al. 1998) y por consiguiente podría influir en la modulación de la absorción del fármaco a través de la piel.

El pH, que también es un parámetro que se ha descrito que varía con una ritmicidad circadiana y que puede influir en la ionización de las moléculas (Menczel & Goldberg 1978) no se seleccionó para el estudio debido a que tanto la formulación escogida, que contiene un emulsionante no iónico, como la MLT, no se ionizan en el rango de pH de la piel, y por tanto su ritmicidad no influiría en la absorción de esta sustancia

Los 3 parámetros se estudiaron en diversas condiciones ambientales con el objetivo de hacer una caracterización completa y simular circunstancias que pueden provocar la

pérdida o atenuación de los ritmos circadianos. Las condiciones de estudio incluyeron la temperatura ambiental, que o se mantuvo constante o se alternó entre el día y la noche, y la influencia lumínica, en la que se estudiaron ritmos de LD 12:12, DD y LL. Adicionalmente, durante todo el estudio se registró la actividad motora, que sirvió para identificar la estabilidad del ritmo circadiano del animal.

Cuando la temperatura externa se mantuvo constante, se observó que la relación entre los ritmos de todas las variables fue independiente a las condiciones de iluminación, lo que indica la conservación de un orden temporal interno. En este sentido, tanto en LD como en DD, la acrofase del ritmo de actividad motora siempre se produjo al final de la primera mitad de la noche subjetiva, y el de la temperatura al final de la segunda mitad de la noche subjetiva. En el caso de la hidratación de la piel, la acrofase siempre se produjo en la segunda mitad de la noche subjetiva.

La TEWL fue la variable en la que la manifestación de los ritmos fue menos evidente. Durante las primeras semanas no se presentó un ritmo circadiano en esta variable, sin embargo, una vez instaurado su ritmo circadiano, la acrofase siempre se mantuvo paralela a la T_s . La falta de ritmo en las primeras semanas se atribuyó a dos posibles motivos, el primero era al propio desarrollo de la rata, en el sentido de que las diferencias de día y de noche en esta variable no son claras en animales jóvenes y aparecen cuando el animal se convierte en adulto. El segundo es que la aparición del ritmo circadiano de la TEWL depende de la existencia de un cierto nivel de amplitud en el ritmo de temperatura. Esto explicaría por qué cuando la amplitud del ritmo T_s era pequeña, no existía ritmo de TEWL (LD₁ y DD₁), mientras que el ritmo de TEWL apareció cuando el ritmo de la temperatura mostró una amplitud elevada (LD₂).

En los seres humanos, se ha descrito que la TEWL aumenta por la noche (Reinberg et al. 1995). Por lo tanto, en ratas (nocturnas) y seres humanos (diurnos) parecen aumentar las funciones de la piel por la noche, lo que sugiere la independencia de estos ritmos de la actividad del individuo. Esto podría ser debido al hecho de que el ritmo circadiano de estas variables está más relacionado con el funcionamiento del reloj central del NSQ que a la propia actividad motora, y sugiere una adaptación evolutiva de la piel hacia el día y la noche.

Para comprobar la relación entre la temperatura ambiental y las variables de la piel, se estudiaron las fluctuaciones circadianas cuando la temperatura ambiental era alta durante el día y baja durante la noche y viceversa. Este estudio demostró que la temperatura cutánea oscila paralelamente a la temperatura externa, y en estas condiciones la TEWL posee el mismo ritmo que la T_s , por lo que su acrofase correspondió a la fase con la temperatura ambiental más alta. En este sentido, nuestros resultados concuerdan con Spruit y Malten (Spruit & Malten, 1971), quien sugirió que la variación diurna en TEWL de la piel es una función de la variación diurna de la T_s . La T_s varía como consecuencia de las modificaciones en el grado de dilatación del sistema vascular subcutáneo, que se producen en respuesta a los cambios de temperatura ambiental y al flujo sanguíneo (Luber et al. 2014).

La TEWL representa la difusión pasiva de agua hacia el exterior y es dependiente de la temperatura de la superficie de la piel (Mathias et al., 1981). De acuerdo con esto, las variaciones encontradas en la TEWL podrían estar indirectamente relacionadas con los cambios vasculares como consecuencia de posibles movimientos del agua a través de los capilares. En los seres humanos la TEWL alcanza sus niveles más altos alrededor de las 03:00 h (Denda & Tsuchiya 2000), que corresponde a la acrofase de la temperatura cutánea.

En lo que se refiere a la SCH, al contrario que la TEWL, los resultados demostraron que esta variable no está influida por la temperatura ambiental. La SCH es una propiedad constituyente de la estructura de la piel de los animales y por lo tanto es lógico que no sea fácilmente modificada por factores externos tales como la temperatura. La SCH tiene un papel importante en las funciones de la piel tales como la regulación de la proliferación epidérmica, la diferenciación y la inflamación (Man et al., 2009) y está regulada por los emulsionantes naturales. En los seres humanos, los valores de SCH medidos con corneómetro son más altos en verano (Qiu et al., 2011) debido al aumento del sebo, pero no se han podido detectar variaciones diarias en la SCH (Yosipovitch et al. 1998).

Los valores de SCH usando el Corneometer 825 y los valores de TEWL usando el Tewameter, obtenidos en las ratas *Hairless* son similares a los valores encontrados en seres humanos, con valores por encima de 40 UA y $9-14 \text{ g} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{h}^{-1}$, respectivamente (Firooz et al., 2012), lo que confirma la utilidad de las ratas *Hairless* en la investigación dermatológica.

Cuando los animales se mantuvieron bajo condiciones de luz constante, que es una situación que altera el acoplamiento de los osciladores del *pacemaker* circadiano (Chiesa et al., 2010; Ohta et al., 2005), no se detectaron ritmos circadianos. Estos resultados concuerdan con los experimentos que muestran ritmos en los genes reloj de la piel en condiciones de LD y DD, pero que no se detectan cuando se lesiona el núcleo supraquiasmático de los animales, lo que sugiere la dependencia de los relojes de la piel del reloj del NSQ (Tanioka et al., 2009).

Nuestros resultados también indicaron que la SCH y la TEWL no están directamente relacionados (Dykes, 2002), ya que la TEWL está mucho más ligado a la temperatura ambiental que la SCH. Es importante remarcar que la SCH y la TEWL se correlacionaron de manera distinta con la temperatura cutánea cuando los animales presentaron un ritmo circadiano o cuando están arrítmicos. En condiciones de presencia de ritmo, existe una correlación lineal entre la TS, SCH y TEWL. Esta correlación es más fuerte cuando la temperatura ambiental aumenta durante la oscuridad; que corresponde a la fase de actividad de la rata, lo que refuerza el ritmo normal de la rata. Cuando la temperatura ambiental se opone al ritmo endógeno (mayor durante la fase de luz, correspondiente a la fase de reposo de la rata), sólo se correlaciona con la TEWL y la temperatura cutánea. Por otra parte, en condiciones de arritmicidad, la temperatura externa y la cutánea se correlacionaron positivamente con la TEWL, pero negativamente con la hidratación del SC. Esto sugiere que los mecanismos de regulación del agua en el estrato córneo no son compensados por la temperatura ambiental.

Teniendo en cuenta que la presencia de los ritmos circadianos en los aspectos funcionales de la piel ha sido documentada en varias especies y en los seres humanos, no es de extrañar que la rata *Hairless* presente variaciones diarias en sus propiedades de la piel.

Fase 3. Estudio cronofarmacocinético in vivo de la formulación con MLT

Una vez evidenciada la presencia de ritmos circadianos y conocidas las acrofases para las variables analizadas en cada condición, se procedió con el último bloque de estudio de la tesis doctoral, el estudio cronofarmacocinético de la MLT administrada por vía transdérmica, tal y como se recoge en el **Artículo 4**.

Los estudios de cronofarmacocinética se realizaron en condición de LD a temperatura constante. Por lo tanto, para decidir las horas de las administraciones se tuvo en cuenta la acrofase de los 3 parámetros analizados en el **Artículo 3**, que se producían en la segunda mitad de la fase de actividad de los animales. Las administraciones de MLT se realizaron a ZT16, correspondiente a la fase de actividad del animal, fase en la que se encontraron los mayores valores de hidratación, pérdida de agua transepidérmica y de temperatura cutánea y en ZT4, correspondiente a la fase de reposo del animal y en los que los valores anteriores eran mínimos. Administrando a estos tiempos, prácticamente todo el estudio caía o bien en la fase de actividad o bien en la fase de reposo.

Aunque nuestro objetivo fue estudiar la farmacocinética de la MLT después de la administración transdérmica en dos momentos diferentes del día, no se encontró información sobre la farmacocinética de esta sustancia después de la administración intravenosa en esta especie, por eso, el estudio se completó con la administración intravenosa de la MLT a los mismos tiempos que en el estudio transdérmico para conocer los parámetros intrínsecos y farmacocinéticos y poder predecir la biodisponibilidad absoluta de la MLT administrada por vía transdérmica. Con el fin de saber si ésta sería una verdadera alternativa a la vía oral para ejercer efectos sistémicos en los tratamientos de regulación del sueño o *jet-lag*, una dosis única de MLT se administró por vía oral a ZT16 y se hizo una comparación de la biodisponibilidad absoluta.

El análisis farmacocinético de los datos plasmáticos después de la administración intravenosa demostró que a ZT16, el valor extrapolado de C_0 y AUC_0^∞ fueron significativamente menores que en ZT4, y al mismo tiempo, CL_P , V_c , V_p y V_{dss} fueron significativamente mayores en ZT16. Estas diferencias podrían explicarse por diferencias en la distribución, la eliminación o el metabolismo dependiendo de la hora del día. La literatura describe que, para los seres humanos y roedores, estos procesos no son constantes sino que muestran fluctuaciones circadianas, que tienden a ser más altas durante la fase de actividad (Radzialowski & Bousquet 1968; Lemmer & Bathe 1982; Pons et al. 1996; Levi & Schibler 2007; Boulamery et al. 2007; Baraldo 2008). En ese sentido, las diferencias en el flujo sanguíneo afectan a la velocidad de la distribución de sustancias en el compartimiento central y a las estructuras extravasculares, lo que lleva a la obtención de volúmenes de distribución superiores (Doménech et al. 2013). Si el flujo sanguíneo que llega a un órgano también es mayor, puede incrementar la velocidad de depuración de la

sustancia, obteniendo valores de CL_p más altos (Baraldo 2008). Este nivel más alto de flujo sanguíneo durante la fase de actividad de la rata puede explicar que, a pesar de la administración de la misma dosis, se obtuvieran valores diferentes para C_0 , AUC_0^∞ , V_{dss} y CL_p . La microconstante de distribución (K_{12}) a pesar de no mostrar diferencias estadísticamente significativas entre ambos ZTs parece ser mayor en ZT16, y reforzaría la teoría de que las diferencias se deben principalmente a diferencias en la distribución. Comparando V_c y V_p aunque se encontraron diferencias estadísticamente significativas para los dos volúmenes, al comparar las medias, las diferencias fueron mayores para V_p , en ZT16 se encontró un volumen diez veces más alto que en ZT4. Otros autores han descrito diferencias significativas en los parámetros farmacocinéticos de MLT en ratas después de la administración en bolus o infusión en función de la hora del día. Por ejemplo, Chan et al. observaron también que en la mitad de la fase de actividad, CL_p , V_c y V_p fueron significativamente mayores que en la mitad de la fase de reposo (Chan et al. 1984), sin embargo, a diferencia de nosotros encontraron mayores volúmenes de V_p que para V_c . El CL_p es la suma de todos los valores individuales en los diversos órganos depurativos, como el hígado (CL_H) o los riñones (CL_R). En nuestro estudio no se ha determinado el CL individual, por lo que las hipótesis deben hacerse con precaución, pero está claro que CL_p es estadísticamente superior en ZT16, que es la fase de la actividad de la rata y por tanto corresponde con el mayor flujo sanguíneo y el máximo flujo hepático corporal (Baraldo 2008), por esa razón, teniendo en cuenta que la MLT tiene una alta tasa de extracción hepática (Lane & Moss 1985), que está muy influenciada por las fluctuaciones en el flujo sanguíneo (Doménech et al. 2013), se postula que las diferencias observadas se deben a CL_H . Este supuesto no coincidiría con el estudio de Huether et al. que demostraron que no había diferencias estadísticamente significativas en el metabolismo hepático de la MLT en función de la hora del día (Huether et al. 1999).

Por otro lado, Huether et al observaron que a pesar de infundir la misma dosis de MLT, las concentraciones en estado de equilibrio estacionario de MLT eran más bajas durante la fase de oscuridad lo que coincide con nuestros resultados (Huether et al. 1999). Por otro lado, es ampliamente conocido que la MLT en el plasma circula parcialmente unida a la albúmina (Cardinali et al. 1972) y se ha descrito que ésta tiene un ritmo circadiano con niveles máximos durante la fase de actividad (Cardinali et al. 1972; Agrasal et al. 2001). Esta ritmicidad de la albúmina justificaría en parte las diferencias encontradas en C_0 y AUC_0^∞

ya que el método analítico utilizado para determinar la concentración de MLT plasmática sólo determina la molécula libre y no la unida a la albúmina.

El análisis farmacocinético de la vía transdérmica mostró la misma diferencia con respecto a las AUC_0^∞ , con valores más altos durante ZT4 que ZT16. Para C_{max} , a pesar de que la media en ZT4 era mayor, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas. Al analizar la absorción, los resultados del análisis compartimental mostraron grandes diferencias en K_a entre ZT16 y ZT4, siendo la K_a más de cuatro veces superior en ZT6. El parámetro P, que es la velocidad de absorción, también fue mayor en ZT16 que en ZT4, por lo que ambos parámetros refuerzan la hipótesis de que la absorción durante la fase de actividad del animal es más rápida que durante la fase de reposo. Hasta el momento, sólo dos estudios han sido publicados sobre las diferencias circadianas en la absorción de la piel después de la administración de fármacos (Reinberg et al. 1995; Bruguerolle et al. 1991), y ambos concluyeron que hay diferencias en la C_{max} y t_{max} en función de la hora de administración. Bruguerolle *et al.* administraron lidocaína a ratas por vía transdérmica y encontraron concentraciones más altas durante la mañana, es decir, durante la fase de reposo, lo que coincide con nuestros resultados (Bruguerolle et al. 1991). Se ha descrito que durante la actividad de las ratas, se alcanzan los niveles máximos de TEWL, y de temperatura de la piel y el flujo sanguíneo aumenta. Todos estos parámetros promueven la absorción del fármaco durante la fase de actividad (Shahzad et al. 2015; Baraldo 2008; Bolzinger et al. 2012) y sería la razón de las diferencias encontradas. Además el estudio del **Artículo 3** también demostró que la TEWL, la T_s y la SCH de la piel aumentaban durante la fase de actividad, lo que se relaciona con una mayor permeación de los fármacos. Por otra parte, el hecho de que t_{max} apareciera antes durante ZT16 y la semivida de K_a fuera estadísticamente menor reforzaría la idea que durante la fase de actividad el paso de MLT a través de la piel está facilitado. La biodisponibilidad absoluta de MLT por vía transdérmica es reducida, del 2% a ZT16 y del 6% a ZT4, lo que significa que la MLT está más disponible para ejercer sus acciones en ZT4 que en ZT16.

Al comparar la vía oral y la transdérmica a ZT16, se observó que a pesar de administrar la misma dosis de MLT, se obtuvo una AUC_0^∞ mucho más alta después de la administración oral. Esta diferencia hace que la biodisponibilidad oral sea diez veces mayor que por vía transdérmica. Aunque a primera vista podría parecer que la MLT administrada por vía transdérmica no es una buena alternativa a la ruta oral para ejercer acciones sistémicas, hay

que tener en cuenta que en ocasiones, como podría ser la existencia de cáncer en el tracto digestivo o problemas de deglución, la vía oral está limitada o desaconsejada y el uso de la vía transdérmica sería una buena alternativa. Además, la vía dérmica sería la mejor opción en el caso de tratamientos de radioterapia debido a que la radiación se aplica en la piel, lo que acostumbra a producir efectos secundarios tales como la xerosis o la dermatosis (Di Franco et al. 2013) y el emoliente de la formulación M68, es hidratante y tiene propiedades de reestructuración de la piel (Savic et al. 2007). Este efecto de la formulación, adicionalmente al efecto de la MLT en la piel y a nivel sistémico como antioxidante ayudaría a paliar los efectos adversos de los rayos-X o radiaciones- γ (Kim et al. 2001; Tobias W Fischer et al. 2008; Vijayalaxmi et al. 2004). Si además la emulsión administrada fuera la que contiene los 3 filtros solares, se obtendrían mayores concentraciones tanto en piel como en plasma y por tanto habría más cantidad de MLT para ejercer sus acciones antioxidantes. No obstante, la emulsión M68, administrada en ambos ZTs en esta especie, conseguiría en plasma las concentraciones necesarias para prevenir los efectos secundarios producidos por agentes oxidantes, ya que se alcanzan concentraciones de $2,75 \times 10^{-6}$ M a ZT4 y de $1,29 \times 10^{-6}$ M a ZT16 y por tanto estarían dentro del rango de 10^{-3} a 10^{-6} M (Fischer et al. 2008).

Los metabolitos de MLT son bien conocidos y han sido ampliamente descritos (Hirata et al. 1974; Tan et al. 1998; Tan et al. 2007). Algunos de ellos, como el AFMK y su sucesor AMK, poseen potentes propiedades antioxidantes (Mayo et al. 2005; Burkhardt 2001; Ressmeyer et al. 2003; Manda et al. 2007). El metabolito AFMK se genera por la interacción de la MLT con varios agentes, por ejemplo H_2O_2 (Hirata et al. 1974), el citocromo C (Horstman et al. 2002), 1O_2 (Almeida et al. 2003; Hardeland et al. 1995), el radical carbonato y $ONOO^-$ (Ressmeyer et al. 2003). Por lo tanto, además del análisis de la MLT, el metabolito AFMK también se analizó para ver si se observaban diferencias en función de la vía y la hora del día de administración. Los resultados mostraron la presencia de este metabolito en todos los estudios. Al comparar los valores de todos los estudios, para el parámetro C_{max}/D , se obtuvieron los máximos valores después de la administración IV y los mínimos después de la administración oral. Estas diferencias podrían explicarse porque por una vía extravasal, antes de llegar a la circulación sistémica, la MLT se transforma en AFMK y esta a su vez, en AMK. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas para el parámetro AUC_0^∞/D entre las vías transdérmica e IV,

sin embargo, el valor de AUC_0^∞ / D obtenido después de la administración oral fue significativamente menor. Esta diferencia podría explicarse porque otras vías metabólicas son mayoritarias tras el paso de la MLT por el hígado, o debido a la transformación del AFMK durante el paso por el hígado en AMK. AFMK y AMK son potentes antioxidantes por lo que cuando la MLT se metaboliza, se mantiene o incluso incrementa la actividad antioxidante (Tan et al. 2007). En ese sentido, teniendo en cuenta los niveles de AFMK, la vía transdérmica mantendría la capacidad antioxidante durante más tiempo que la vía oral y los efectos antioxidantes derivados de AFMK serían mayores.

En cuanto a la cantidad de MLT retenida en la piel a los 45 minutos tras la administración a ZT16 y ZT4, se encontró una mayor cantidad de MLT en la administración ZT4. Como se ha mencionado anteriormente, durante la fase de actividad existe un flujo sanguíneo más alto con valores más altos de T_s , TEWL y SCH (Bolzinger et al. 2012). La cantidad de MLT que pasa a través de la piel a la circulación sistémica es mayor y en consecuencia, los niveles encontrados en la piel en ZT16 son menores que en ZT4. Los resultados demuestran que la administración transdérmica de la misma cantidad de MLT en ambos ZTs conduce a diferencias en la cantidad de esta sustancia en la piel, y por ende, a diferencias en la cantidad de MLT disponible para realizar una acción local.

No existen estudios previos que analicen la cantidad retenida de MLT en la piel en dos ZTs diferentes, pero este experimento pone de relieve la importancia de incluir el tiempo de administración como una variable cuando se realizan estudios de permeación en la piel.

Las diferencias en los tiempos de latencia entre los estudios *ex vivo*, **Artículo 1 y 2** e *in vivo*, **Artículo 4**, son debidos en parte a las diferencias de permeabilidad de la piel de rata *Hairless* y la humana y en parte debido a que la aplicación de la emulsión en los estudios *in vivo* y *ex vivo* son distintos. Es decir, en los estudios *ex vivo*, la emulsión se coloca en la fase donadora y se deja que poco a poco vaya penetrando en la piel, por lo que el proceso es lento. En cambio en los estudios *in vivo*, para evitar que la rata se eliminara los excedentes, la emulsión se masajeó hasta su completa penetración. Además, esto es lo que hacen los seres humanos cuando se aplican cremas.

En base a los resultados obtenidos, este estudio demuestra que igual que para otras rutas, es importante tener en cuenta la hora del día a la que un fármaco se administra por vía transdérmica, ya que las fases de absorción, distribución, metabolismo y eliminación varían

y pueden influir en la farmacocinética y farmacodinamia de estas sustancias. La MLT, administrada por vía transdérmica, tiene diferente comportamiento farmacocinético cuando se aplica en ZT16 o ZT4 en la rata *Hairless*, y se espera que estas diferencias se observen también en los humanos. Su mejor biodisponibilidad junto con los mayor valores de AUC_0^∞ y MRT, menores de CL_P y las mayores cantidades retenidas en la piel, han demostrado que la fase de reposo sería la más apropiada para administrar estas emulsiones de MLT, ya que se conseguirían mayores acciones locales y sistémicas.

No obstante, es necesario realizar el estudio en humanos para comprobar si los resultados se replican y saber cuál sería el mejor momento del día para administrar MLT por vía transdérmica dependiendo de la aplicación que se le dará a esta sustancia.

Muchos cosméticos y fármacos dérmicos se aplican por la noche por recomendación, pero no se tiene en cuenta el ritmo endógeno del individuo ni la temperatura ambiental y como se ha comprobado en el **Artículo 3**, estos tienen influencia en los ritmos de la piel y por tanto la absorción en condiciones distintas a las habituales podría diferir a las estudiadas. Por lo tanto, estas variables deben considerarse al establecer directrices en dermatología, cuando se aplican formulaciones a nivel dérmico. Además, las alteraciones en la SCH y en la pérdida de agua transepidérmica están asociadas con algunos trastornos de la piel y por tanto, es importante conocer sus fluctuaciones circadianas con en el fin de no malinterpretar los valores obtenidos en medidas puntuales. Por lo tanto,

Por último, se estudió la influencia de la radiación UV en el eritema cutáneo cuando la radiación es aplicada en los mismos ZTs anteriores, tal y como se recoge en el **Artículo 5**. Para este estudio se usó la emulsión con filtros solares, MMIX ya que era la que podía ejercer una mayor acción protectora según los resultados del **Artículo 2**. Cuando la radiación se aplicó a ZT16, tanto la formulación MMIX como su equivalente sin MLT, presentó una acción protectora contra el eritema cutáneo, no observándose un mayor efecto protector en la que contenía MLT. Mostrando únicamente la zona control irradiada valores de eritema significativamente más altos que en el resto de zonas. Sin embargo, cuando la radiación se aplicó en ZT4, en ninguna de las zonas se observaron diferencias significativas en el incremento de eritema, por lo que el mismo tiempo de exposición a 2 horas del día distinta no tuvieron los mismos efectos sobre la piel.

CAPÍTULO V. CONCLUSIONES

Las conclusiones que se han extraído de la presente tesis doctoral han sido las siguientes:

Respecto a la fase de desarrollo de formulaciones de aplicación dérmica y transdérmica con MLT:

1. Se ha desarrollado y validado un método analítico para la cuantificación de MLT en HPLC que ha demostrado ser lineal, exacto, preciso y específico para esta sustancia.
2. Se han desarrollado 4 formulaciones para uso dérmico y con un 1% de MLT. Tras los estudios realizados *ex vivo*, la emulsión M68 es la más idónea para ejercer tanto acciones sistémicas como locales.
3. De las emulsiones M68, la MMIX, que combina la MLT con los 3 filtros solares ha demostrado tener una potente actividad antioxidante para depurar el radical libre DPPH, junto con niveles de permeación y de retención en la piel de MLT adecuados.

Respecto a la fase de selección del modelo animal y caracterización de los ritmos funcionales de la piel:

4. Los ritmos circadianos están presentes en los parámetros de SCH, TEWL y Ts en rata *Hairless*.
5. Existen diferencias en la regulación circadiana de TEWL y SCH con respecto a los ritmos de Ts y la influencia del medio ambiente.
6. Existen diferencias dependientes del tiempo en la TEWL que se reflejan tanto en las fluctuaciones diarias como en un aumento lineal de acuerdo con la edad de los animales.
7. Los ritmos funcionales de la piel dependen de la ritmicidad endógena circadiana y de las condiciones ambientales térmicas y son independientes de la actividad motora.

Respecto a la fase de estudio cronofarmacocinético *in vivo* de la formulación con MLT:

8. Existe una variación circadiana en la farmacocinética de la MLT administrada por vía transdérmica en rata *Hairless*, comparando ZT4 y ZT16.
9. Los mayores valores de AUC_0^∞ y MRT, menores de CL_P y las mayores cantidades retenidas en la piel, hacen que la fase de reposo sea la más apropiada para

administrar estas emulsiones de MLT, ya que se conseguiría una mayor acción tanto local como sistémica.

10. La MLT añadida en emulsiones con filtros solares no se ha demostrado que mejore la acción protectora frente al eritema causado por UV en el modelo animal y las condiciones estudiadas.

Como conclusiones generales de la presente tesis doctoral se destaca:

- i. Tanto en los diseños experimentales como clínicos de fármacos aplicados en la piel, es crucial tener en cuenta la presencia de ritmos circadianos de las variables fisiológicas de la piel para la correcta interpretación de los resultados.
- ii. Es necesaria la introducción de la modulación circadiana en las ecuaciones que definen el paso de los fármacos por el organismo. Así, se mejoraría la precisión de las estimaciones de los parámetros, reduciendo su variabilidad, y ayudaría a definir la hora de administración dérmica o transdérmica óptima.

CAPÍTULO VI.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

A

- Agency, E.M., 2014. *Ficha técnica o Resumen de las Características del producto Circadin 2mg*, London.
- Agrasal, C. et al., 2001. Effect of melatonin on 24h changes in plasma protein levels during the preclinical phase of Freund's adjuvant arthritis in rats. *Chronobiology international*, 18(3), pp.435–446.
- Almeida, E.A. et al., 2003. Oxidation of melatonin by singlet molecular oxygen (O₂(¹Δg)) produces N1-acetyl-N2-formyl-5-methoxykynurenine. *Journal of Pineal Research*, 35(2), pp.131–137.
- Almeida, H. et al., 2012. Pluronic(R) F-127 and Pluronic Lecithin Organogel (PLO): main features and their applications in topical and transdermal administration of drugs. *Journal of pharmacy & pharmaceutical sciences: a publication of the Canadian Society for Pharmaceutical Sciences, Societe canadienne des sciences pharmaceutiques*, 15(4), pp.592–605.
- Antolin, I. et al., 1996. Neurohormone melatonin prevents cell damage: effect on gene expression for antioxidant enzymes. *FASEB J*, 10(8), pp.882–890.
- Antolín, I. et al., 2002. Protective effect of melatonin in a chronic experimental model of Parkinson's disease. *Brain Research*, 943(2), pp.163–173.
- Aschoff, J., King, F.A. & Stricker, E.M., 1981. *Handbook of Behavioral Neurobiology: Biological rhythms*, Plenum Press.
- Aschoff, J. & Pohl, H., 1978. Phase relations between a circadian rhythm and its zeitgeber within the range of entrainment. *Die Naturwissenschaften*, 65(2), pp.80–84.
- Attwood, D. & Florence, A., 1983. *Surfactant systems: Their chemistry, pharmacy and biology*. Ed. Chapman & Hall, 1983., Wiley Subscription Services, Inc., A Wiley Company.

B

- Badr, F.M., El Habit, O.H. & Harraz, M.M., 1999. Radioprotective effect of melatonin assessed by measuring chromosomal damage in mitotic and meiotic cells. *Mutation research*, 444(2), pp.367–372.
- Balsalobre, A., 2002. Clock genes in mammalian peripheral tissues. *Cell and tissue research*, 309(1), pp.193–199.
- Bangha, E., Elsner, P. & Kistler, G., 1996. Suppression of UV-induced erythema by topical treatment with melatonin (N-acetyl-5-methoxytryptamine). A dose response study. *Archives of Dermatological Research*, 288(9), pp.522–526.
- Bangha, E., Elsner, P. & Kistler, G., 1997. Suppression of UV-induced erythema by topical treatment with melatonin (N-acetyl-5-methoxytryptamine). Influence of the application time point. *Dermatology*, 195(3), pp.248–252.
- Baraldo, M., 2008. The influence of circadian rhythms on the kinetics of drugs in humans. *Expert opinion on drug metabolism & toxicology*, 4(2), pp.175–192.

- Barjavel, M. et al., 1998. Differential expression of the melatonin receptor in human monocytes. *J Immunol*, 220, pp.975–978.
- Barlow-Walden, L.R. et al., 1995. Melatonin stimulates brain glutathione peroxidase activity. *Neurochemistry International*, 26(5), pp.497–502.
- Baron, J.M. & Merk, H.F., 2001. Drug metabolism in the skin. *Current opinion in allergy and clinical immunology*, 1(4), pp.287–291.
- Becker-Andre, M. et al., 1994. Pineal gland hormone melatonin binds and activates an orphan of the nuclear receptor superfamily. *J. Biol. Chem.*, 269(46), pp.28531–28534.
- Berthaud, F. & Boncheva, M., 2011. Correlation between the properties of the lipid matrix and the degrees of integrity and cohesion in healthy human Stratum corneum. *Experimental Dermatology*, 20(3), pp.255–262.
- Blask, D.E. et al., 2004. Melatonin uptake and growth prevention in rat hepatoma 7288CTC in response to dietary melatonin: melatonin receptor-mediated inhibition of tumor linoleic acid metabolism to the growth signaling molecule 13-hydroxyoctadecadienoic acid and the potential rol. *Carcinogenesis*, 25(6), pp.951–960.
- Bolzinger, M.-A. et al., 2012. Penetration of drugs through skin, a complex rate-controlling membrane. *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, 17(3), pp.156–165.
- Bonn, D. & Denn, M.M., 2009. Materials science. Yield stress fluids slowly yield to analysis. *Science (New York, N.Y.)*, 324(5933), pp.1401–1402.
- Boulamery, A. et al., 2007. Chronopharmacokinetics of Imipenem in the Rat. *Chronobiology International*, 24(5), pp.961–968.
- Bronaugh, R.L. & Maibach, H.I., 1999. *Percutaneous Absorption: Drugs--Cosmetics--Mechanisms--Methodology: Drugs--Cosmetics--Mechanisms--Methodology, Third Edition*, CRC Press.
- Bruguerolle, B., Giaufre, E. & Prat, M., 1991. Temporal variations in transcutaneous passage of drugs: the example of lidocaine in children and in rats. *Chronobiology international*, 8(4), pp.277–282.
- Buijs, R.M. & Kalsbeek, A., 2001. Hypothalamic integration of central and peripheral clocks. *Nature reviews. Neuroscience*, 2(7), pp.521–526.
- Burkhardt, S., 2001. DNA oxidatively damaged by chromium(III) and H₂O₂ is protected by the antioxidants melatonin, N1-acetyl-N2-formyl-5-methoxykynuramine, resveratrol and uric acid. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 33(8), pp.775–783.

C

- Cadorniga, R., 1990. [Chrono-pharmacokinetics. Therapeutic implications]. *Anales de la Real Academia Nacional de Medicina*, 107(2), pp.185–214.

- Cambras, T. & Díez, A., 2014. *Ritmes de la vida, Els. Com la cronobiologia ens ajuda a viure millor*, Publicacions i Edicions de la Universitat de Barcelona.
- Cardinali, D.P., Lynch, H.J. & Wurtman, R.J., 1972. Binding of Melatonin to Human and Rat Plasma Proteins. *Endocrinology*, 91(5), pp.1213–1218.
- Cassone, V.M., Chesworth, M.J. & Armstrong, S.M., 1986. Dose-dependent entrainment of rat circadian rhythms by daily injection of melatonin. *Journal of biological rhythms*, 1(3), pp.219–229.
- Chan, M.-Y. et al., 1984. Studies on the Kinetics of Melatonin and N-Acetylserotonin in the Rat at Mid-Light and Mid-Dark. *Journal of Pineal Research*, 1(3), pp.227–236.
- Cho, J., Kim, C. & Lee, K., 2007. Modification of gene expression by melatonin in UVB-irradiated HaCaT keratinocyte cell lines using a cDNA microarray. *Oncology Reports*, 17(3), pp.573–577.
- Choy, Y. Bin & Prausnitz, M.R., 2011. The rule of five for non-oral routes of drug delivery: ophthalmic, inhalation and transdermal. *Pharmaceutical research*, 28(5), pp.943–948.
- Clemens, M.R. et al., 1990. Plasma vitamin E and beta-carotene concentrations during radiochemotherapy preceding bone marrow transplantation. *The American journal of clinical nutrition*, 51(2), pp.216–219.
- Cos, S. et al., 2006. Estrogen-signaling pathway: a link between breast cancer and melatonin oncostatic actions. *Cancer detection and prevention*, 30(2), pp.118–128.
- Cross, S.E. & Roberts, M.S., 2000. The effect of occlusion on epidermal penetration of parabens from a commercial allergy test ointment, acetone and ethanol vehicles. *The Journal of investigative dermatology*, 115(5), pp.914–918.

D

- Dellegar, S.M. et al., 1999. Identification of the factors affecting the rate of deactivation of hypochlorous acid by melatonin. *Biochemical and biophysical research communications*, 257(2), pp.431–9.
- Denda, M. & Tsuchiya, T., 2000. Barrier recovery rate varies time-dependently in human skin. *The British journal of dermatology*, 142(5), pp.881–884.
- Desotelle, J. a, Wilking, M.J. & Ahmad, N., 2012. The circadian control of skin and cutaneous photodamage. *Photochemistry and photobiology*, 88(5), pp.1037–47.
- Díaz, M.S. & Pareja, J.A., 2008. Tratamiento del insomnio. *IT del Sistema Nacional de Salud*, 32(4), pp.116–122.
- Díez-Noguera, A., 2005a. Cronodiagnóstico: análisis de los ritmos y valores de referencia. In J. Tamargo & J. Barberá, eds. *CRONO Biología, Patología, Farmacología*. Madrid: Ediciones Mayo.
- Díez-Noguera, A., 2005b. Ritmos biológicos en los seres vivos. In J. Tamargo & J. Barberá, eds. *CRONO Biología, Patología, Farmacología*. Madrid: Ediciones Mayo, pp. 1–20.

- Dirier, A. et al., 2007. The effect of vitamin E on acute skin reaction caused by radiotherapy. *Clinical and experimental dermatology*, 32(5), pp.571–573.
- Doménech, J., Martínez, J. & Peraire, C., 2013. *Tratado general de Biofarmacia y Farmacocinética* 1st ed., Madrid: Editorial Síntesis, S.A.
- Doménech, J., Martínez, J. & Plá, J.M., 1998. *Biofarmacia y Farmacocinética, Volumen II: Biofarmacia* 1st ed., Madrid: Editorial Síntesis, S.A.
- Doménech-Berrozpe, J.D., Martínez-Lanao, J.M. & Plá-Delfina, J.M.P., 1997. *Biofarmacia y farmacocinética*, Síntesis.
- Dopfel, R.P., Schulmeister, K. & Schernhammer, E.S., 2007. Nutritional and lifestyle correlates of the cancer-protective hormone melatonin. *Cancer detection and prevention*, 31(2), pp.140–148.
- Dreher, F. et al., 1999. Effect of Topical Antioxidants on UV-Induced Erythema Formation when Administered after Exposure. *Dermatology*, 198, pp.52–55.
- Dubocovich, M.L. & Markowska, M., 2005. Functional MT1 and MT2 melatonin receptors in mammals. *Endocrine*, 27(2), pp.101–110.
- Dudley, C.A. et al., 2003. Altered patterns of sleep and behavioral adaptability in NPAS2-deficient mice. *Science (New York, N.Y.)*, 301(5631), pp.379–383.

E

- Effendy, I. & Maibach, H.I., 1995. Surfactants and experimental irritant contact dermatitis. *Contact dermatitis*, 33(4), pp.217–225.

F

- Faber, M. et al., 1995. Lipid peroxidation products, and vitamin and trace element status in patients with cancer before and after chemotherapy, including adriamycin. A preliminary study. *Biological trace element research*, 47(1-3), pp.117–123.
- Faithfull, S. & Wells, M., 2003. Radiation skin reactions. In *Supportive Care in Radiotherapy*. Churchill Livingstone, pp. 135–159.
- Fang, J.-Y. et al., 2003. In vitro and in vivo evaluations of the efficacy and safety of skin permeation enhancers using flurbiprofen as a model drug. *International journal of pharmaceuticals*, 255(1-2), pp.153–166.
- Faure, H. et al., 1996. 5-Hydroxymethyluracil excretion, plasma TBARS and plasma antioxidant vitamins in adriamycin-treated patients. *Free radical biology & medicine*, 20(7), pp.979–983.
- Federico, A. et al., 2007. Chronic inflammation and oxidative stress in human carcinogenesis. *International journal of cancer. Journal international du cancer*, 121(11), pp.2381–2386.
- Fischer, T. et al., 2006. Melatonin increases survival of HaCaT keratinocytes by suppressing UV-induced apoptosis. *Journal of pineal research*, 40(1), pp.18–26.

- Fischer, T.W. et al., 2006. Constitutive and UV-induced metabolism of melatonin in keratinocytes and cell-free systems. *FASEB journal: official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 20(9), pp.1564–6.
- Fischer, T.W. et al., 2008. Melatonin as a major skin protectant: from free radical scavenging to DNA damage repair. *Experimental dermatology*, 17(9), pp.713–30.
- Fischer, T.W. et al., 2008. Melatonin maintains mitochondrial membrane potential and attenuates activation of initiator (casp-9) and effector caspases (casp-3/casp-7) and PARP in UVR-exposed HaCaT keratinocytes. *Journal of pineal research*, 44(4), pp.397–407.
- Fischer, T.W. et al., 2001. Melatonin reduces UV-induced reactive oxygen species in a dose-dependent manner in IL-3-stimulated leukocytes. *Journal of Pineal Research*, 31(1), pp.39–45.
- Fischer, T.W. et al., 2004. Melatonin suppresses reactive oxygen species induced by UV irradiation in leukocytes. *Journal of pineal research*, 37(2), pp.107–12.
- Ford, D.E. & Kamerow, D.B., 1989. Epidemiologic study of sleep disturbances and psychiatric disorders. An opportunity for prevention? *JAMA*, 262(11), pp.1479–1484.
- Fore, J., 2006. A Review of Skin and the Effects of Aging on Skin Structure and Function. *Ostomy wound management*, 52(9).
- Di Franco, R. et al., 2013. Preventing the acute skin side effects in patients treated with radiotherapy for breast cancer: the use of corneometry in order to evaluate the protective effect of moisturizing creams. *Radiation oncology (London, England)*, 8, p.57.
- Fridovich, I., 1978. The biology of oxygen radicals. *Science (New York, N.Y.)*, 201(4359), pp.875–880.
- Fuchs, J. et al., 2001. Redox-modulated pathways in inflammatory skin diseases. *Free Radical Biology and Medicine*, 30(4), pp.337–353.
- Fuchs-Tarlovsky, V., 2013. Role of antioxidants in cancer therapy. *Nutrition (Burbank, Los Angeles County, Calif.)*, 29(1), pp.15–21.
- Fukada, Y. & Okano, T., 2002. Circadian clock system in the pineal gland. *Molecular neurobiology*, 25(1), pp.19–30.

G

- García Fernandez, J.M., 1998. Los ritmos biológicos y sus fundamentos neuronales. *Síntesis, Madrid*, pp.778–799.
- Gaspar, L. & Maia Campos, P., 2003. Rheological behavior and the SPF of sunscreens. *International journal of pharmaceutics*, 250(1), pp.35–44.
- Geyfman, M. & Andersen, B., 2009. How the skin can tell time. *The Journal of investigative dermatology*, 129(5), pp.1063–1066.
- Gilbert, J.C. et al., 1986. Drug release from Pluronic F-127 gels. *International Journal of*

Pharmaceutics, 32(2-3), pp.223–228.

Godin, B. & Touitou, E., 2007. Transdermal skin delivery: predictions for humans from in vivo, ex vivo and animal models. *Advanced drug delivery reviews*, 59(11), pp.1152–1161.

Grace, M.S., Cahill, G.M. & Besharse, J.C., 1991. Melatonin deacetylation: retinal vertebrate class distribution and *Xenopus laevis* tissue distribution. *Brain Research*, 559(1), pp.56–63.

H

Haddadi, G.H. & Fardid, R., 2015. Oral administration of melatonin modulates the expression of tumor necrosis factor-alpha (TNF-alpha) gene in irradiated rat cervical spinal cord. *Reports of practical oncology and radiotherapy: journal of Great Poland Cancer Center in Poznan and Polish Society of Radiation Oncology*, 20(2), pp.123–127.

Hadgraft, J. & Guy, R.H., 1989. *Transdermal drug delivery*. J. Hadgraft & R. H. Guy, eds., Marcel Dekker: New York.

Halberg, F., 1977. *Glossary of chronobiology = Glossario di cronobiologia*, Little Rock, Ark.: International Society for Chronobiology, International Committee of Nomenclature.

Halberg, F. & Halberg, E., 1984. Chronopharmacology and further steps toward chronotherapy. In L. Z. Benet, N. Massoud, & J. G. Gambertoglio, eds. *Pharmacokinetic basis for drug treatment*. Raven Press, pp. 221–248.

Halberg, F., Peterson, R.E. & Silber, R.H., 1959. Phase relations of 24-hour periodicities in blood corticosterone, mitoses in cortical adrenal parenchyma, and total body activity. *Endocrinology*, 64(2), pp.222–230.

Halliwell, B., 1993. The chemistry of free radicals. *Toxicology and industrial health*, 9(1-2), pp.1–21.

Hanson, K.M., Gratton, E. & Bardeen, C.J., 2006. Sunscreen enhancement of UV-induced reactive oxygen species in the skin. *Free radical biology & medicine*, 41(8), pp.1205–1212.

Hardeland, R., 2008. Melatonin, hormone of darkness and more: occurrence, control mechanisms, actions and bioactive metabolites. *Cellular and molecular life sciences : CMLS*, 65(13), pp.2001–18.

Hardeland, R. et al., 1995. On the primary functions of melatonin in evolution: mediation of photoperiodic signals in a unicell, photooxidation, and scavenging of free radicals. No Title. *J Pineal Res*, 18(2), pp.104–111.

Hardeland, R. et al., 2003. Oxidation of melatonin by carbonate radicals and chemiluminescence emitted during pyrrole ring cleavage. *Journal of Pineal Research*, 34(1), pp.17–25.

Hardeland, R. et al., 1993. The significance of the metabolism of the neurohormone melatonin: antioxidative protection and formation of bioactive substances.

- Neuroscience and biobehavioral reviews*, 17(3), pp.347–357.
- Hardeland, R., Pandi-Perumal, S.R. & Cardinali, D.P., 2006. Melatonin. *The international journal of biochemistry & cell biology*, 38(3), pp.313–6.
- Hardin, P.E., Hall, J.C. & Rosbash, M., 1990. Feedback of the Drosophila period gene product on circadian cycling of its messenger RNA levels. *Nature*, 343(6258), pp.536–540.
- Harpsøe, N. et al., 2015. Clinical pharmacokinetics of melatonin: a systematic review. *European Journal of Clinical Pharmacology*, 71(8), pp.901–909.
- Healy, D. & Waterhouse, J.M., 1995. The circadian system and the therapeutics of the affective disorders. *Pharmacology & therapeutics*, 65(2), pp.241–263.
- Hirata, F. et al., 1974. In Vitro and in Vivo Formation of Two New Metabolites of Melatonin. *J. Biol. Chem.*, 249(4), pp.1311–1313.
- Hofman, M.A., 2004. The brain's calendar: neural mechanisms of seasonal timing. *Biological reviews of the Cambridge Philosophical Society*, 79(1), pp.61–77.
- Horstman, J.A., Wrona, M.Z. & Dryhurst, G., 2002. Further insights into the reaction of melatonin with hydroxyl radical. *Bioorganic Chemistry*, 30(5), pp.371–382.
- Huether, G. et al., 1999. *Tryptophan, Serotonin, and Melatonin: Basic aspects and Applications*, Springer US, pp. 852.

J

- Jain, N.K., Shah, B.K. & Taneja, L.N., 1991. Nasal absorption of metoprolol tartrate. *Indian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 53, pp.16–19.
- Jung, E.C. & Maibach, H.I., 2014. Animal Models for Percutaneous Absorption. In V. P. Shah, H. I. Maibach, & J. Jenner, eds. *Topical Drug Bioavailability, Bioequivalence, and Penetration SE - 2*. Springer New York, pp. 21–40.
- Jurado, J.L., Luna-Villegas, G. & Buéla-Casal, G., 1989. Normal human subjects with slow reaction times and larger time estimations after waking have diminished delta sleep. *Electroencephalography and clinical neurophysiology*, 73(2), pp.124–128.

K

- Kafka, M.S., Marangos, P.J. & Moore, R.Y., 1985. Suprachiasmatic nucleus ablation abolishes circadian rhythms in rat brain neurotransmitter receptors. *Brain research*, 327(1-2), pp.344–347.
- Kelly, R.W., Amato, F. & Seamark, R.F., 1984. N-acetyl-5-methoxy kynurenamine, a brain metabolite of melatonin, is a potent inhibitor of prostaglandin biosynthesis. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 121(1), pp.372–379.
- Kim, B.C. et al., 2001. Melatonin reduces X-ray irradiation-induced oxidative damages in cultured human skin fibroblasts. *Journal of dermatological science*, 26(3), pp.194–200.

- Koleng, J.J. & McGinity, J.W., 2006. Carbomer. In R. C. Rowe, P. J. Sheskey, & S. C. Owen, eds. *Handbook of Pharmaceutical Excipient*. London: Pharmaceutical Press, pp. 111–115.
- Korf, H.W., Schomerus, C. & Stehle, J.H., 1998. The pineal organ, its hormone melatonin, and the photoneuroendocrine system. *Advances in anatomy, embryology, and cell biology*, 146, pp.1–100.
- Kriegsfeld, L.J., Korets, R. & Silver, R., 2003. Expression of the circadian clock gene Period 1 in neuroendocrine cells: an investigation using mice with a Per1::GFP transgene. *The European journal of neuroscience*, 17(2), pp.212–220.

L

- Ladner, C. et al., 1989. Effect of etoposide (VP16-213) on lipid peroxidation and antioxidant status in a high-dose radiochemotherapy regimen. *Cancer chemotherapy and pharmacology*, 25(3), pp.210–212.
- Lane, E.A. & Moss, H.B., 1985. Pharmacokinetics of Melatonin in Man: First Pass Hepatic Metabolism. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 61(6), pp.1214–1216.
- Leak, R.K. & Moore, R.Y., 2001. Topographic organization of suprachiasmatic nucleus projection neurons. *The Journal of comparative neurology*, 433(3), pp.312–334.
- Lee, K.-S. et al., 2003. Melatonin reduces ultraviolet-B induced cell damages and polyamine levels in human skin fibroblasts in culture. *Experimental & Molecular Medicine*, 35, pp.263–268.
- Leeson, T., Leeson, C. & Paparo, A., 1990. *Texto/atlas de histología*, Ed. Interamericana Mc Graw Hill.
- Lemmer, B. & Bathe, K., 1982. Stereospecific and circadian-phase-dependent kinetic behavior of d,l-, l-, and d-propranolol in plasma, heart, and brain of light-dark-synchronized rats. *Journal of cardiovascular pharmacology*, 4(4), pp.635–644.
- Leon, J. et al., 2004. Melatonin and mitochondrial function. *Life sciences*, 75(7), pp.765–90.
- Leon-Blanco, M.M. et al., 2003. Melatonin inhibits telomerase activity in the MCF-7 tumor cell line both in vivo and in vitro. *Journal of pineal research*, 35(3), pp.204–211.
- Leopold, C.S. & Lippold, B.C., 1995. Enhancing effects of lipophilic vehicles on skin penetration of methyl nicotinate in vivo. *Journal of pharmaceutical sciences*, 84(2), pp.195–198.
- Levi, F. & Schibler, U., 2007. Circadian rhythms: mechanisms and therapeutic implications. *Annual review of pharmacology and toxicology*, 47, pp.593–628.
- Lin, H.R. & Sung, K.C., 2000. Carbopol/pluronic phase change solutions for ophthalmic drug delivery. *Journal of controlled release: official journal of the Controlled Release Society*, 69(3), pp.379–388.

- Lissoni, P. et al., 2003. Five years survival in metastatic non-small cell lung cancer patients treated with chemotherapy alone or chemotherapy and melatonin: a randomized trial. *Journal of pineal research*, 35(1), pp.12–15.
- Liu, X. et al., 2002. Melatonin as an effective protector against doxorubicin-induced cardiotoxicity. *American journal of physiology. Heart and circulatory physiology*, 283(1), pp.H254–63.
- Loden, M., 2003. Role of topical emollients and moisturizers in the treatment of dry skin barrier disorders. *American journal of clinical dermatology*, 4(11), pp.771–788.
- Lopez-Burillo, S., Tan, D. & Rodriguez-Gallego, V., 2003. Melatonin and its derivatives cyclic 3-hydroxymelatonin, N1- acetyl-N2-formyl-5-methoxykynuramine and 6-hydroxymelatonin reduce oxidative DNA damage induced by Fenton reagents. *J Pineal Res*, 34, pp.178–184.
- Lowrey, P.L. & Takahashi, J.S., 2004. Mammalian circadian biology: elucidating genome-wide levels of temporal organization. *Annual review of genomics and human genetics*, 5, pp.407–441.
- Luber, A.J., Ensanyat, S.H. & Zeichner, J.A., 2014. Therapeutic implications of the circadian clock on skin function. *Journal of drugs in dermatology*, 13(2), pp.130–134.
- Luchetti, F. et al., 2009. ERK MAPK activation mediates the antiapoptotic signaling of melatonin in UVB-stressed U937 cells. *Free radical biology & medicine*, 46(3), pp.339–51.
- Luchetti, F. et al., 2006. Melatonin prevents apoptosis induced by UV-B treatment in U937 cell line. *Journal of pineal research*, 40(2), pp.158–67.

M

- Ma, X. et al., 2005. Metabolism of melatonin by human cytochromes p450. *Drug metabolism and disposition: the biological fate of chemicals*, 33(4), pp.489–494.
- Maci, M. et al., 2000. Melatonin but not vitamins C and E maintains glutathione homeostasis in t-butyl hydroperoxide- induced mitochondrial oxidative stress. *FASEB J*, 14(12), pp.1677–1679.
- Maestroni GJ, Covacci V, C.A., 1994. Hematopoietic rescue via T-cell-dependent, endogenous granulocyte-macrophage colony-stimulating factor induced by the pineal neurohormone melatonin in tumor-bearing mice. *Cancer Res*, 54, pp.2429–2432.
- Maharaj, D.S. et al., 2002. The identification of the UV degradants of melatonin and their ability to scavenge free radicals. *J Pineal Res*, 32(4), pp.257–261.
- Maharaj, D.S., Limson, J.L. & Daya, S., 2003. 6-Hydroxymelatonin converts Fe (III) to Fe (II) and reduces iron-induced lipid peroxidation. *Life Sciences*, 72(12), pp.1367–1375.
- Maibach, H., 1984. Dermatological formulations: Percutaneous absorption. By Brian W. Barry. Marcel Dekker, 270 Madison Avenue, New York, NY 10016. 479 pp.

- Journal of Pharmaceutical Sciences*, 73(4), p.573.
- Makai, M. et al., 2003. Structure and drug release of lamellar liquid crystals containing glycerol. *International journal of pharmaceutics*, 256(1-2), pp.95–107.
- Manda, K., Ueno, M. & Anzai, K., 2007. AFMK, a melatonin metabolite, attenuates X-ray-induced oxidative damage to DNA, proteins and lipids in mice. *Journal of pineal research*, 42(4), pp.386–393.
- Mantovani, A. et al., 2008. Cancer-related inflammation. *Nature*, 454(7203), pp.436–444.
- Markova-Car, E.P. et al., 2014. Running for time: circadian rhythms and melanoma. *Tumour biology: the journal of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine*, 35(9), pp.8359–8368.
- Matuszak, Z. et al., 2007. Interaction of Singlet Molecular Oxygen with Melatonin and Related Indoles. *Photochemistry and Photobiology*, 78(5), pp.449–455.
- Mayersbach, H., 1976. Time -- a key in experimental and practical medicine. *Archives of toxicology*, 36(3-4), pp.185–216.
- Mayo, J. et al., 2002. Melatonin regulation of antioxidant enzyme gene expression. *Cell Mol Life Sci*, 59(10), pp.1706–1713.
- Mayo, J.C. et al., 2005. Anti-inflammatory actions of melatonin and its metabolites, N1-acetyl-N2-formyl-5-methoxykynuramine (AFMK) and N1-acetyl-5-methoxykynuramine (AMK), in macrophages. *Journal of neuroimmunology*, 165(1-2), pp.139–49.
- Meijer, J.H. & Rietveld, W.J., 1989. Neurophysiology of the suprachiasmatic circadian pacemaker in rodents. *Physiological reviews*, 69(3), pp.671–707.
- Menczel, E. & Goldberg, S., 1978. pH effect on the percutaneous penetration of lignocaine hydrochloride. *Dermatologica*, 156(1), pp.8–14.
- Menon, G.K., 2002. New insights into skin structure: scratching the surface. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 54(1), pp.3-17.
- Mills, E. et al., 2005. Melatonin in the treatment of cancer: a systematic review of randomized controlled trials and meta-analysis. *Journal of pineal research*, 39(4), pp.360–366.
- Moller, M. & Baeres, F.M.M., 2002. The anatomy and innervation of the mammalian pineal gland. *Cell and tissue research*, 309(1), pp.139–150.
- Moore, R.Y. & Eichler, V.B., 1972. Loss of a circadian adrenal corticosterone rhythm following suprachiasmatic lesions in the rat. *Brain research*, 42(1), pp.201–206.
- Mora, F. & Sanguinetti, A.M., 1994. *Diccionario de neurociencias*, Alianza Editorial.
- Myers, D., 2002. Emulsions. In *Surfaces, Interfaces, and Colloids*. John Wiley & Sons, Inc., pp. 253–294.

N

- Nair, C.K., Parida, D.K. & Nomura, T., 2001. Radioprotectors in radiotherapy. *Journal of radiation research*, 42(1), pp.21–37.
- Nickel, A. & Wohlrab, W., 2000. Melatonin protects human keratinocytes from UVB irradiation by light absorption. *Archives of Dermatological Research*, 292(7), pp.366–368.
- Nielsen, F.S., Petersen, K.B. & Mullertz, A., 2008. Bioavailability of probucol from lipid and surfactant based formulations in minipigs: influence of droplet size and dietary state. *European journal of pharmaceutics and biopharmaceutics : official journal of Arbeitsgemeinschaft fur Pharmazeutische Verfahrenstechnik e.V*, 69(2), pp.553–562.
- Nikovska, K., 2010. Oxidative stability and rheological properties of oil-in-water emulsions with walnut oil. *Advance Journal of Food Science and Technology*, 2(3), pp.172–177.

P

- Pablos, M.I. et al., 1995. Melatonin stimulates the activity of the detoxifying enzyme glutathione peroxidase in several tissues of chicks. *Journal of Pineal Research*, 19(3), pp.111–115.
- Padilla, M., Clark, G.T. & Merrill, R.L., 2000. Topical medications for orofacial neuropathic pain: a review. *Journal of the American Dental Association (1939)*, 131(2), pp.184–195.
- Padillo, F.J. et al., 2010. Melatonin and celecoxib improve the outcomes in hamsters with experimental pancreatic cancer. *Journal of pineal research*, 49(3), pp.264–270.
- Papadopoulou, V. et al., 2006. On the use of the Weibull function for the discernment of drug release mechanisms. *International journal of pharmaceutics*, 309(1-2), pp.44–50.
- Pasquali, R.C., Bregni, C. & Serrao, R., 2006. Características e identificación de los cristales líquidos liotrópicos. *Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas*, 37(2), pp.38–53.
- Perez, I.P., 2006. *Sistemas poliméricos inteligentes con entrecruzamiento biodegradable*. Universidad Complutense de Madrid.
- Peyrot, F. et al., 2003. Reactivity of Peroxynitrite with Melatonin as a Function of pH and CO₂ Content. *European Journal of Organic Chemistry*, 2003(1), pp.172–181.
- Pierrefiche, G. & Laborit, H., 1995. Oxygen free radicals, melatonin, and aging. *Exp Gerontol Pharmacol*, 30, pp.213–227.
- Pillai, S., Oresajo, C. & Hayward, J., 2005. Ultraviolet radiation and skin aging: roles of reactive oxygen species, inflammation and protease activation, and strategies for prevention of inflammation-induced matrix degradation - a review. *International journal of cosmetic science*, 27(1), pp.17–34.
- Pons, M. et al., 1996. Relationship between circadian changes in renal hemodynamics and

circadian changes in urinary glycosaminoglycan excretion in normal rats. *Chronobiology international*, 13(5), pp.349–358.

Porter, M.R., 1991. *Handbook of surfactants*, Blackie.

Q

Qi, W. et al., 2000. Increased levels of oxidatively damaged DNA induced by chromium(III) and H₂O₂: protection by melatonin and related molecules. *Journal of Pineal Research*, 29(1), pp.54–61.

Qiu, Y. & Park, K., 2001. Environment-sensitive hydrogels for drug delivery. *Advanced drug delivery reviews*, 53(3), pp.321–339.

De Queiroz, Á.A.A. et al., 2006. Alginate–poly(vinyl alcohol) core–shell microspheres for lipase immobilization. *Journal of Applied Polymer Science*, 102(2), pp.1553–1560.

R

Radzialowski, F.M. & Bousquet, W.F., 1968. Daily rhythmic variation in hepatic drug metabolism in the rat and mouse. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 163(1), pp.229–238.

Rajaratnam, S.M. & Arendt, J., 2001. Health in a 24-h society. *Lancet (London, England)*, 358(9286), pp.999–1005.

van Ravenzwaay, B. & Leibold, E., 2004. The significance of in vitro rat skin absorption studies to human risk assessment. *Toxicology in Vitro*, 18(2), pp.219–225.

Reinberg, A. et al., 1979. Circadian and ultradian rhythms in the feeding behaviour and nutrient intakes of oil refinery operators with shift-work every 3–4 days. *Diabete & metabolisme*, 5(1), pp.33–41.

Reinberg, A.E. et al., 1995. Circadian dosing time dependency in the forearm skin penetration of methyl and hexyl nicotinate. *Life sciences*, 57(16), pp.1507–1513.

Reiter, R.J., 1993. The melatonin rhythm: both a clock and a calendar. *Experientia*, 49(8), pp.654–664.

Reppert, S.M. & Weaver, D.R., 2002. Coordination of circadian timing in mammals. *Nature*, 418(6901), pp.935–941.

Ressmeyer, A. et al., 2003. Antioxidant properties of the melatonin metabolite N1-acetyl-5-methoxykynuramine (AMK): scavenging of free radicals and prevention of protein destruction. *Redox Report*, 8(4), pp.205–213.

del Rio, L.A. et al., 1992. Metabolism of oxygen radicals in peroxisomes and cellular implications. *Free radical biology & medicine*, 13(5), pp.557–580.

Ritschel, W.A., 1971. *Applied biopharmaceutics I*, Cincinnati, Ohio: College of Pharmacy, Division of Pharmacy Continuing Education, University of Cincinnati.

Ritschel, W.A. & Hussain, A.S., 1988. The principles of permeation of substances across the skin. *Methods and findings in experimental and clinical pharmacology*, 10(1),

pp.39–56.

- Rodríguez, C. et al., 2004. Regulation of antioxidant enzymes: a significant role for melatonin. *Journal of Pineal Research*, 36(1), pp.1–9.
- Rubin, R.T. et al., 1992. Neuroendocrine aspects of primary endogenous depression. XI. Serum melatonin measures in patients and matched control subjects. *Archives of general psychiatry*, 49(7), pp.558–567.
- Ruiz-Rabelo, J.F. et al., 2007. Beneficial properties of melatonin in an experimental model of pancreatic cancer. *Journal of pineal research*, 43(3), pp.270–275.
- Ryu, J.M. et al., 1999. Increased bioavailability of propranolol in rats by retaining thermally gelling liquid suppositories in the rectum. *Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society*, 59(2), pp.163–172.

S

- Sainz, R.M. et al., 2008. Critical role of glutathione in melatonin enhancement of tumor necrosis factor and ionizing radiation-induced apoptosis in prostate cancer cells in vitro. *Journal of pineal research*, 45(3), pp.258–70.
- Salager, J.L., 2002. Surfactants types and uses, *Fire p booket-E300-attaching aid in surfactant science and engineering in English*. Merida Venezuela.
- Sánchez, A., Calpena, A.C. & Clares, B., 2015. Evaluating the Oxidative Stress in Inflammation: Role of Melatonin. *International Journal of Molecular Sciences*, 16(8), p.16981–17004.
- Savic, S. et al., 2007. An alkylpolyglucoside surfactant as a prospective pharmaceutical excipient for topical formulations: the influence of oil polarity on the colloidal structure and hydrocortisone in vitro/in vivo permeation. *European journal of pharmaceutical sciences : official journal of the European Federation for Pharmaceutical Sciences*, 30(5), pp.441–450.
- Schaefer, H. & Filaquier, C., 1992. Skin metabolism. *Pathologie-biologie*, 40(2), pp.196–204.
- Scheuer, C. et al., 2014. Melatonin's protective effect against UV radiation: a systematic review of clinical and experimental studies. *Photodermatology, photoimmunology & photomedicine*, 30(4), pp.180–188.
- Schibler, U. & Sassone-Corsi, P., 2002. A web of circadian pacemakers. *Cell*, 111(7), pp.919–922.
- Scholes, G., 1983. Radiation effects on DNA. The Silvanus Thompson Memorial Lecture, April 1982. *The British journal of radiology*, 56(664), pp.221–231.
- Shah, V. et al., 1991. In Vivo Percutaneous Penetration/Absorption, Washington, D.C., May 1989. *Pharmaceutical Research*, 8(8), pp.1071–1075.
- Shahzad, Y. et al., 2015. Breaching the skin barrier through temperature modulations. *Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society*, 202, pp.1–13.

- Shida, C.S., Castrucci, A.M. & Lamy-Freund, M.T., 1994. High melatonin solubility in aqueous medium. *Journal of pineal research*, 16(4), pp.198–201.
- Siegel, P. V, Gerathewohl, S.J. & Mohler, S.R., 1969. Time-zone effects. *Science (New York, N.Y.)*, 164(3885), pp.1249–1255.
- Slominski, A. et al., 2008. Melatonin in the skin: synthesis, metabolism and functions. *Trends in endocrinology and metabolism: TEM*, 19(1), pp.17–24.
- Steinbach, M.J., 1976. Pursuing the perceptual rather than the retinal stimulus. *Vision research*, 16(12), pp.1371–1376.

T

- Takamura, M. et al., 1991. Rapid reentrainment of the circadian clock itself, but not the measurable activity rhythms to a new light-dark cycle in the rat. *Physiology & behavior*, 50(2), pp.443–449.
- Tamargo, J., 2005. Cronofarmacocinética. In J. Tamargo & J. Barberá, eds. *CRONO Biología, Patología, Farmacología*. Madrid: Ediciones Mayo, pp. 96–113.
- Tan, D.X. et al., 2001. N1-acetyl-N2-formyl-5-methoxykynuramine, a biogenic amine and melatonin metabolite, functions as a potent antioxidant. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 15(12), pp.2294–2296.
- Tan, D.-X. et al., 1998. A Novel Melatonin Metabolite, Cyclic 3-Hydroxymelatonin: A Biomarker of in Vivo Hydroxyl Radical Generation. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 253(3), pp.614–620.
- Tan, D.-X. et al., 2007. One molecule, many derivatives: a never-ending interaction of melatonin with reactive oxygen and nitrogen species? *Journal of pineal research*, 42(1), pp.28–42.
- Tanioka, M. et al., 2009. Molecular clocks in mouse skin. *The Journal of investigative dermatology*, 129(5), pp.1225–1231.
- Tapp, W.N. & Natelson, B.H., 1989. Circadian rhythms and patterns of performance before and after simulated jet lag. *The American journal of physiology*, 257(4 Pt 2), pp.R796–803.
- Taylor, L.J. et al., 2002. Effect of occlusion on the percutaneous penetration of linoleic acid and glycerol. *International Journal of Pharmaceutics*, 249(1-2), pp.157–164.
- Touitou, Y. & Bogdan, A., 2007. Promoting adjustment of the sleep-wake cycle by chronobiotics. *Physiology & behavior*, 90(2-3), pp.294–300.

U

- Urata, Y. et al., 1999. Melatonin induces γ -glutamylcysteine synthetase mediated by activator protein-1 in human vascular endothelial cells. *Free Radical Biology and Medicine*, 27(7-8), pp.838–847.

V

Vijayalaxmi et al., 2004. Melatonin as a radioprotective agent: a review. *International journal of radiation oncology, biology, physics*, 59(3), pp.639–653.

W

Wehr, T.A. et al., 1979. Phase advance of the circadian sleep-wake cycle as an antidepressant. *Science (New York, N.Y.)*, 206(4419), pp.710–713.

Weijl, N.I. et al., 1998. Cisplatin combination chemotherapy induces a fall in plasma antioxidants of cancer patients. *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology / ESMO*, 9(12), pp.1331–1337.

Weinert, D., 2005. The temporal order of mammals. Evidence for multiple central and peripheral control mechanisms and for endogenous and exogenous components: some implications for research on aging. *Biol Rhythm Res*, 36(4), pp.293–308.

Y

Yamazaki, S. et al., 2000. Resetting central and peripheral circadian oscillators in transgenic rats. *Science (New York, N.Y.)*, 288(5466), pp.682–685.

Yonese, M., 2001. Sustained drug delivery by gels. In Y. Osada & K. Kajiwara, eds. *Gels Handbook*. San Diego, CA: Academic Press, pp. 230–240.

Yosipovitch, G. et al., 1998. Time-dependent variations of the skin barrier function in humans: transepidermal water loss, stratum corneum hydration, skin surface pH, and skin temperature. *The Journal of investigative dermatology*, 110(1), pp.20–23.

Z

Zhang, H. et al., 1999. Reaction of Peroxynitrite with Melatonin : A Mechanistic Study. *Chem. Res. Toxicol.*, 12, pp.526–534.

Zhang, H., Squadrito, G.L. & Pryor, W.A., 1998. The reaction of melatonin with peroxynitrite: formation of melatonin radical cation and absence of stable nitrated products. *Biochemical and biophysical research communications*, 251(1), pp.83–87.

Zylka, M.J. et al., 1998. Three period homologs in mammals: differential light responses in the suprachiasmatic circadian clock and oscillating transcripts outside of brain. *Neuron*, 20(6), pp.1103–1110.

ANEXO 1

Capítulo de libro

THE ROLE OF ANTIOXIDANTS IN SUNSCREENS: THE CASE OF MELATONIN

(El rol de los antioxidantes en las cremas solares: el caso de la melatonina)

Ana Flo, Víctor Flo, Ana C. Calpena, Beatriz Clares

**Sharp SH, editor. Sunscreens: Properties, Role in Skin Cancer
Prevention and Health Effects. Nova Science Publishers Incorporated;
2015. p. 39–76.**

Resumen

El principal objetivo de este capítulo fue realizar una revisión detallada del uso de antioxidantes en cremas solares, y más específicamente del uso de MLT.

Con el fin de entender la importancia del uso de antioxidantes en estos productos, se hizo una revisión inicial de la estructura de la piel y de los efectos de la radiación UV. A lo largo del capítulo se discutió la naturaleza de las sustancias fotoprotectoras usadas en las cremas solares, sus mecanismos de acción, sus ventajas y desventajas, tanto de las convencionales, como de las más novedosas, clasificándolas en los siguientes grupos (1) filtros solares orgánicos (2) filtros solares inorgánicos (3) agentes reparadores del ADN (4) inhibidores de la ciclooxigenasa-2 (5) quelantes del hierro (6) osmolitos (7) sustancias antioxidantes naturales.

Numerosos estudios han publicado los beneficios de la MLT usada tanto como protectora de la radiación UV como en combinación de la radioterapia tradicional para el tratamiento de cáncer en humanos. Por esta razón, en este capítulo se realizó una revisión de las características y propiedades de esta sustancia con el fin de remarcar el uso potencial de la MLT en cremas solares.

Nota: el capítulo no se adjunta debido a los Derechos de la editorial.