



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Programa de Pós-Graduação em Nanotecnologia Farmacêutica

**DESENVOLVIMENTO E CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA E
BIOFARMACÊUTICA DE NANO E MICROEMULSÕES LIPÍDICAS
DE USO INTRAVENOSO CONTENDO METILDIDROJASMONATO**

GISELA BEVILACQUA ROLFSEN FERREIRA DA SILVA

ORIENTADOR: Prof. Dr. ANSELMO GOMES DE OLIVEIRA

ARARAQUARA – SP

2013



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Programa de Pós-Graduação em Nanotecnologia Farmacêutica

**DESENVOLVIMENTO E CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA E
BIOFARMACÊUTICA DE NANO E MICROEMULSÕES LIPÍDICAS
DE USO INTRAVENOSO CONTENDO METILDIIDROJASMONATO**

GISELA BEVILACQUA ROLFSEN FERREIRA DA SILVA

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Nanotecnologia Farmacêutica, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, como parte dos requisitos para obtenção do título de doutor em Nanotecnologia Farmacêutica.

ORIENTADOR: Prof. Dr. ANSELMO GOMES DE OLIVEIRA

ARARAQUARA – SP

2013

Candidata: Gisela Bevilacqua Rolfsen Ferreira da Silva

Titulo da Tese:

Desenvolvimento e caracterização físico-química e biofarmacêutica de nano e microemulsões lipídicas de uso intravenoso contendo metildiidrojasmonato.

A Comissão Julgadora dos trabalhos de defesa da Dissertação de Mestrado, em sessão pública realizada em 25/11/2013, consideraram a candidata:

REPROVADA

APROVADA

1) Examinador *Prof. Dr. Eryvaldo Sócrates Tabosa do Egito*

2) Examinadora *Profa. Dra. Vera Lucia Borges Isaac*

3) Examinador *Prof. Dr. Osvaldo de Freitas*

2) Examinador *Prof. Dr. Marco Vinícius Chaud*

5) Presidente *Prof. Dr. Anselmo Gomes de Oliveira*

Ficha Catalográfica

Elaborada Pelo Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
UNESP – Campus de Araraquara

S586d Silva, Gisela Bevilacqua Rolfsen Ferreira da
Desenvolvimento e caracterização físico-química e biofarmacêutica de nano e microemulsões lipídicas de uso intravenoso contendo metildiidrojasmonato / Gisela Bevilacqua Rolfsen Ferreira da Silva. – Araraquara, 2013
165 f.

Tese (Doutorado) – Universidade Estadual Paulista. “Júlio de Mesquita Filho”. Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Programa de Pós Graduação Interinstitucional em Nanotecnologia Farmacêutica
Orientador: Anselmo Gomes de Oliveira

1. Microemulsões. 2. Nanoemulsões. 3. Metildiidrojasmonato. 4. Administração intravenosa. 5. Câncer. I. Oliveira, Anselmo Gomes de, orient. II. Título.

CAPES: 40300005

DEDICATÓRIA

Durante meus experimentos *in vivo* meus filhos gostavam de conhecer meus camundongos.

Um dia minha filha Gabriela me perguntou:

- Mãe, seus ratinhos são fêmeas ou “fêmeos”?

Então eu respondi:

- Na verdade são fêmeas ou machos que se diz. Mas meus ratinhos são fêmeas.

Ela rebateu:

- Como que você sabe que são fêmeas? Por acaso elas já chegam com laços na cabeça?

Por essas e outras infinitas passagens da minha família e da pesquisa que adoro fazer, é que sei que a vida vale à pena.

Dedico este trabalho aos meus filhos Gabriela e Lucas, razões da minha vida.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a meu querido orientador, Prof. Dr. Anselmo Gomes de Oliveira, que me auxiliou nas dúvidas da parte prática, me corrigiu na parte teórica e ainda muito mais além, pode me guiar para ser uma melhor pesquisadora.

Agradeço aos meus pais, Ricardo e Silvia, pelo carinho, pelo constante incentivo a minha profissão e incontável ajuda com as crianças. Amo Vocês.

Agradeço aos meus irmãos, Andréia e Rafael, por serem meus pilares nos momentos difíceis e amigos maravilhosos nas alegrias da vida.

Agradeço ao meu querido marido Rangel, pelo incentivo na minha parte profissional e pelo amor e carinho na nossa batalha diária. Te amo.

Agradeço aos meus avôs: Silvio, Olga e Raphael, pela ajuda, pelo apoio e incentivo aos estudos e a querida vovó Magaly pela enorme disposição e carinho com as crianças nos momentos que tanto precisei.

Agradeço aos meus sogros Luzia e Zezito, e cunhados Rafaela e Victor, pela ajuda sempre com meus filhos e pelas pessoas maravilhosas que são.

Agradeço a todos os amigos do laboratório: Ana Luiza, Andréia, Andressa, Bruno, Charlene, Cristiane, Fernanda C., Fabíola, Flávia, Flávio, Giovana Cintra, Giovana Calixto,

Agradecimentos

Gustavo, Jéssica, Karisa, Léo, Liliane, Marcela, Márcia, Roberta, Vanessa, e em especial as queridas e sempre presentes amigas Bia, Lilian, Fernanda Kolenyak, e Maria Gabriela.

Agradeço a Fernanda Kolenyak, Charlene, Ana Luiza e Liliane pela ajuda com o permeador. Sempre aos domingos se dispuseram a me ajudar e me salvar. E a Giovana Calixto pela ajuda com o rêometro.

Agradeço aos professores do nosso laboratório de Tecnologia Farmacêutica: Prof^a. Dra. Ana Dóris de Castro, Prof^a. Dra. Maria Palmira Daflon Gremião, Prof. Dr. Marlus Chorilli e em especial ao querido amigo Prof. Dr. Raul César Evangelista.

Agradeço as secretárias da pós-graduação Laura, Joyce, Cláudia e Daniela pela atenção e ajuda dedicadas durante esses anos.

Ao querido amigo Alberto Alécio, por sempre estar disposto a ajudar de forma muito útil com seu carinho e inteligência e ao Prof. Dr. José Eduardo de Oliveira e Rodrigo com o estudo da cromatografia gasosa.

A querida amiga Marcela Bassi Quilles, pela grande ajuda, paciência e conhecimento transmitido com o experimento *in vivo*.

Ao laboratório IPC-Araraquara, em especial a Graciola pela ajuda com os cortes histológicos e ao Prof. Dr. Raphael Carlos Comelli Lia pelo grande carinho e atenção dedicada na ajuda com as análises histológicas.

Agradecimentos

Ao Prof. Dr. Celso Santilli e a Profa. Dra. Sandra do Departamento de Físico-Química do Instituto de Química da UNESP - Araraquara pela disponibilização do seu laboratório para que fossem realizadas as análises de difração de Raios-X.

A Profa. Dra. Maria Vitória Badra Bentley da Faculdade de Farmácia da USP-Ribeirão Preto pela disponibilização do seu laboratório para realizar análises de espalhamento dinâmico de luz.

Ao Prof. Dr. João Aristeu da Rosa por permitir a utilização do microscópio de luz polarizada.

A Profa. Dra. Vera Lúcia Borges Isaac pela disponibilização do reômetro para as análises reológicas, além dos imensuráveis ensinamentos destas análises.

Agradeço a Profa. Dra. Vera Lúcia Borges Isaac e a Profa. Dra. Maria Palmira Daflon Gremião pelas críticas construtivas, conselhos e transmissão de conhecimento no Exame Geral de Qualificação.

Agradeço ao Prof. Dr. Eryvaldo Sócrates Tabosa do Egito, a Profa. Dra. Vera Lúcia Borges Isaac, ao Prof. Dr. Osvaldo de Freitas e ao Prof. Dr. Marco Vinicius Chaud pelos conselhos durante minha Defesa de Tese de Doutorado.

Ao serviço técnico de Biblioteca e ao Serviço de apoio da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da UNESP-Araraquara.

A CAPES pelo apoio financeiro.

RESUMO

Os jasmonatos compõem uma nova família de agentes anti-câncer, naturais ou semi-sintéticos, com comprovada eficácia contra diferentes tipos de tumores em crescimento. Esses compostos exibem seletividade citotóxica em células transformadas. Nanocarreadores coloidais como micro e nanoemulsões, podem proporcionar a liberação do fármaco no sítio de ação desejado minimizando os efeitos colaterais que normalmente acompanham os medicamentos convencionais. Neste trabalho foram desenvolvidas formulações de micro (ME) e nanoemulsões (NE) contendo o fármaco metildiidrojasmonato (MJ) com o objetivo de obter sistemas nanoestruturados com atividade antineoplásica. Foram desenvolvidos três diagramas de fases, o primeiro sem MJ, o segundo contendo MJ e o terceiro com MJ como fase oleosa. Com base nos diagramas 32 formulações foram selecionadas, variando-se a proporção de fase oleosa (óleo de soja), de tensoativo (sais de ácidos graxos, fosfatidilcolina de soja e glicerol) e de MJ. As formulações foram caracterizadas físico-quimicamente e com a técnica de light scattering foi observado que o diâmetro das gotículas aumentou com a incorporação do fármaco e com o aumento da proporção do MJ. Com o aumento da proporção de tensoativo o diâmetro diminuiu nas formulações na ausência do fármaco e aumentou nas formulações com o fármaco incorporado. Com o aumento de fase oleosa o diâmetro foi reduzindo nas formulações na ausência e presença de fármaco. Com as análises de reologia foi possível observar que o comportamento de fluxo destas formulações variou entre newtoniano, pseudoplástico, tixotrópico, anti-tixotrópico e reopético. Com base na microscopia de luz polarizada foi possível observar que as formulações na ausência e presença do fármaco e aquelas com variação de MJ apresentaram campo escuro com rara presença de cruz de malta. Já as formulações em que MJ foi utilizado como fase oleosa ocorreu presença de gotas de óleo na microscopia de luz polarizada. A maioria das

formulações apresentou características de estruturas cristalinas através da difração de raios-X. As curvas de SAXS demonstram que nas formulações na ausência de MJ ocorreu uma organização estrutural à medida que se aumentou a fase oleosa, proporção de tensoativo e proporção de fármaco. A incorporação de MJ promoveu uma desestruturação organizacional. O potencial zeta sofreu uma queda em módulo quando MJ foi incorporado nas formulações e quando a proporção deste fármaco foi aumentada. Mas o potencial zeta sofreu aumento em módulo nas formulações tendo MJ como fase oleosa, à medida que se aumentou proporção de fase oleosa e tensoativo. No ensaio de liberação *in vitro* as ME e NE comportaram-se como sistemas reservatórios retardando a liberação do MJ. Com a análise da atividade antitumoral *in vivo* foi observado que a porcentagem de inibição do volume tumoral da solução micelar de MJ (SM-MJ) superou a do controle positivo, com doxorrubicina. À medida que a concentração de MJ incorporado a microemulsão (MJ-ME) foi aumentando a porcentagem de inibição tumoral manteve-se praticamente constante. O grau de angiogênese foi mais baixo para a doxorrubicina e solução micelar de MJ quando comparado com salina e ME vazia. Já para os grupos tratados com MJ-ME os valores do grau de angiogênese mantiveram-se altos. A média da massa dos tumores foi maior para os grupos tratados com salina e ME vazia e menor para os tratados com doxorrubicina e solução micelar de MJ. Já os grupos tratados com MJ-ME obtiveram redução na massa à medida que a concentração de MJ-ME aumentou. Foi possível obter sistemas de liberação prolongada, micro e nanoemulsões, capazes de transportar e direcionar o MJ no organismo de modo a atingir as células tumorais permitindo administração intravenosa.

ABSTRACT

The jasmonates are a new family of anti-cancer agents, natural and semi-synthetic, with proven efficacy against several tumor growth. These compounds exhibit a selective cytotoxic for tumor cells. Colloidal nanocarriers as micro (ME) and nanoemulsions (NE), provide drug release at the desired site of action while minimizing the side effects that often follow the use of conventional drugs. The methyl dihydro jasmonate (MJ) was added in order to obtain nanostructured systems with antineoplastic activity. Three phase diagrams were developed, one of them without drug, the second with drug and the third with MJ replacing the oil phase. Based on the phase diagrams 32 formulations were selected by varying the percentage of the oily phase (soya oil), of the surfactants (fatty acids salts, soya phosphatidylcholine and glycerol) and of the MJ. The formulations were analyzed by their physico-chemical characterization. With the technique of light scattering it was observed that the diameter of the droplets increased with the incorporation of the drug and with the increase of the MJ percentage. By increasing the surfactants percentage, the droplet diameter decreased in formulations without MJ and increased in formulations with the drug. With the oil phase increase the droplet diameter was reduced in formulations with and without MJ. The rheology evaluation studied revealed that the flow behavior of the formulations ranged as newtonian, pseudoplastic, thixotropic, anti-thixotropic and reopetic. Based on the polarized light microscopy it was observed that the formulations, with and without MJ showed dark field with rare presence of Maltese cross. In the formulations where MJ was used as the oil phase, the presence of microscopic oil droplets was observed. The majority of the formulations exhibit characteristics of crystalline structures by X-ray diffraction. The SAXS curves show that, in the formulations without MJ, structural organization occurred when the oil phase was increased, the percentage of surfactants and the percentage of drug increased. A disruption has occurred when MJ was incorporated in the formulations. The zeta potential

decreased in module when MJ was incorporated in the formulations and when the percentage of the drug increased. However, the zeta potential increased in module, in the formulations having MJ as the oil phase, as the percentage of oil phase and surfactant increased. In the *in vitro* release assay the ME and NE systems behaved as reservoirs delaying the release of MJ. Through the analysis of antitumor activity *in vivo* it can be observed that the percentage inhibition of tumor volume of MJ micellar solution exceeded the positive control, doxorubicin. As the concentration of MJ-ME increasing the percentage of tumor inhibition remained almost constant. The angiogenesis degree was lower for doxorubicin and micellar solution compared to the saline and the formulation without MJ. However, the groups treated with MJ-ME revealed a high degree of angiogenesis. The average weight of the tumors was higher in the groups treated with saline and with the formulation without MJ and lower for those treated with doxorubicin and MJ micellar solution. As for the groups treated with MJ-ME there was reduction of the weight tumors as the MJ concentration increased on the ME. It was possible to obtain sustained release systems, micro and nanoemulsions, able to carry and direct the MJ in order to reach tumor cells allowing intravenous administration.

ABREVIATURAS

A/O - Água em óleo

A - Fase Aquosa

CG - Cromatografia gasosa

DOXO - Doxorrubicina

EHL - Equilíbrio Hidrófilo Lipófilo

FID - Detector por chama de íons

FS - Fosfatidilcolina de soja

G - Glicerol

IT- Inibição do volume tumoral

MAGS - Sistema de Gradação para Angiogênese por Microscopia

MJ - Metildiidrojasmonato

MJ-ME – Microemulsão contendo metildiidrojasmonato

ME - Microemulsão

NE- Nanoemulsão

O - Fase Oleosa

O/A - Óleo em água

RPMI-1640 - Meio de cultura de tecido animal desidratado

SAG – Sais de ácidos graxos

SAXS - Espalhamento de raios-X a baixo ângulo

SM- Solução micelar

SF - Separação de fases

STL - Sistema Transparente Líquido

STV - Sistema Transparente Viscoso

Abreviaturas

SOL - Sistema Opaco Líquido

SOV - Sistema Opaco Viscoso

T - Sistema emulsivo

TAE – Tumor Ascítico de Ehrlich

TCM – Triglicérido de Cadeia Média

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estrutura química dos derivados do jasmonato, metiljasmonato (a), ácido jasmônico (b), cis-jasmone (c) e metildiidrojasmonato (d).....29

Figura 2. Estrutura química da fosfatidilcolina, onde R1 e R2 são ácidos graxos variáveis.....39

Figura 3. Estrutura química do glicerol.....40

Figura 4. Reação de saponificação (SANTOS *et al.*, 2007).....42

Figura 5. Estrutura química do laurato de sódio (SANTOS *et al.* 2007).....42

Figura 6. Representação esquemática da auto-organização de tensoativo em estruturas lamelares e hexagonais (HOLMQVIST *et al.*, 1997).....50

Figura 7. Diagrama de fases pseudoternário de sistemas contendo SAG/G/FS (T), Óleo de soja (O) e Água ultra pura (A). Legenda: Sistema Transparente Líquido (STL), Sistema Transparente Viscoso (STV), Sistema Opaco Líquido (SOL), Sistema Opaco Viscoso (SOV). Pontos em vermelho representam as composições específicas das formulações estudadas na ausência de MJ.....71

Figura 8. Diagrama de fases pseudoternário de sistemas contendo SAG/G/FS (T), Óleo de soja (O), Água ultra pura (A) e MJ (20%). Legenda: Sistema Transparente Líquido (STL), Sistema Transparente Viscoso (STV), Sistema Opaco Líquido (SOL), Sistema Opaco Viscoso (SOV).....73

Figura 9. Diagrama de fases pseudoternário de sistemas contendo SAG/G/FS (T), MJ como fase oleosa (O) e Água ultra pura (A). Legenda: Sistema Transparente Líquido (STL), Sistema Transparente Viscoso (STV), Sistema Opaco Líquido (SOL), Sistema Opaco Viscoso (SOV) e Separação de fases (SF). Pontos em vermelho representam as composições específicas das formulações estudadas contendo o MJ como fase oleosa.....75

Figura 10. Variação do raio hidrodinâmico das gotículas em função da fase oleosa na: a) ausência de fármaco; e b) presença de fármaco; e em função da proporção de tensoativo na: c) ausência de fármaco; e d) presença de fármaco.....84

Figura 11. Variação do raio hidrodinâmico das gotículas em função do: a) aumento da proporção de MJ como fármaco; b) do aumento da proporção de MJ como fase oleosa; c) aumento da proporção de tensoativo.....86

Figura 12. Perfil reológico das formulações em função: a) da proporção de fase oleosa na ausência de MJ e b) presença de MJ; e em função: c) da proporção de tensoativo na ausência e d) presença de MJ. As curvas ascendentes e descendentes estão representadas, respectivamente, por símbolos vazios e cheios.....88

Figura 13. Perfil reológico das formulações em função: a) da proporção de MJ; b) da proporção de MJ como fase oleosa; c) da proporção de tensoativo tendo MJ como fase oleosa. As curvas ascendentes e descendentes estão representadas, respectivamente, por símbolos vazios e cheios.....91

Figura 14. Fotomicrografias das formulações preparadas com proporções crescentes de fase oleosa (A: 2,5%, B: 10%, C: 18%, D: 24% e E: 30%) e tensoativo constante (20%) e com proporções crescentes de tensoativo (F: 6%, G: 10%, H: 15%, C: 20% e I: 25%) e fase oleosa constante (18%) na ausência de MJ.....97

Figura 15. Fotomicrografias das formulações preparadas com proporções crescentes de fase oleosa (A: 2,5%, B: 10%, C: 18%, D: 24% e E: 30%) e tensoativo constante (20%) e com proporções crescentes de tensoativo (F: 6%, G: 10%, H: 15%, C: 20% e I: 25%) e fase oleosa constante (18%), na presença de 20% de MJ.....98

Figura 16. Fotomicrografias das formulações preparadas com proporções crescentes de MJ (J: 2,5%, K: 10%, L: 18%, M: 24% e N: 30%).....99

Figura 17. Fotomicrografias das formulações preparadas com proporções crescentes de MJ como fase oleosa (O: 2,5%, P: 10%, Q: 18%, R: 24% e S: 30%) e tensoativo constante (20%) e com proporções crescentes de tensoativo (T: 6%, U: 10%, V: 15%, Q: 20% e W: 25%) e MJ como fase oleosa constante (18%).....100

Figura 18. Difratomogramas dos componentes isolados: sal de ácido graxo, fosfatidilcolina de soja, metildiidrojasmonato, óleo de soja e glicerol.....101

Figura 19. Difratomogramas das formulações preparadas com proporções crescentes de fase oleosa (A: 2,5%, B: 10%, C: 18%, D: 24% e E: 30%) e tensoativo constante (20%) na ausência (a) e presença (b) de MJ.....102

Figura 20. Difratomogramas das formulações preparadas com proporções crescentes de tensoativo (F: 6%, G: 10%, H: 15%, C: 20% e I: 25%) e fase oleosa constante (18%), na ausência (A) e presença (B) de MJ.....103

Figura 21. Difrátograma das formulações preparadas com proporções crescentes de MJ (J: 2,5%, K: 10%, L: 18%, M: 24% e N: 30%).....104

Figura 22. Difratomogramas das formulações preparadas com: (a) proporções crescentes de MJ como fase oleosa (O: 2,5%, P: 10%, Q: 18%, R: 24% e S: 30%) e tensoativo constante (20%) e com: (b) proporções crescentes de tensoativo (T: 6%, U: 10%, V: 15%, Q: 20% e W: 25%) e MJ como fase oleosa constante (18%).....105

Figura 23. Curvas de SAXS das formulações preparadas com proporções crescentes de fase oleosa (A: 2,5%, B: 10%, C: 18%, D: 24% e E: 30%) e tensoativo constante (20%) na ausência (a) e presença (b) de MJ respectivamente.....107

Figura 24. Curvas de SAXS das formulações preparadas com proporções crescentes de tensoativo (F: 6%, G: 10%, H: 15%, C: 20% e I: 25%) e fase oleosa constante (18%), na ausência (a) e presença (b) de MJ respectivamente.....108

Figura 25. Curvas de SAXS das formulações preparadas com proporções crescentes de MJ (K: 8%, L: 12%, M: 16% e N: 20%).....	109
Figura 26. Curvas de SAXS das formulações O: 2,5% de MJ como fase oleosa e 20% de tensoativo e formulação W: 25% de tensoativo e 18% de MJ como fase oleosa.....	110
Figura 27. Variação do potencial zeta em função da fase oleosa: a) na ausência de fármaco; b) na presença de fármaco e em função da proporção de tensoativo: c) na ausência de fármaco e d) na presença de fármaco.....	115
Figura 28. Variação do potencial zeta em função: a) do aumento do metiljamonato como fármaco; b) do aumento da proporção de fármaco como fase oleosa; c) em função do aumento da proporção de tensoativo.....	117
Figura 29. Cromatograma obtido do MJ em metanol por CG acoplado ao detector por íon de chamas.....	124
Figura 30. Curva analítica do MJ em metanol obtida por CG.....	125
Figura 31. Perfil de liberação do MJ na solução micelar (tampão Tris-HCl acrescido de 0,15% laurilsulfato de sódio) contendo 20% de MJ.....	128
Figura 32. Perfil de liberação do MJ nos sistemas com proporções crescentes de fase oleosa (A: 2,5%, B: 10%, C: 18%, D: 24% e E: 30%) e sistema tensoativo constante (20%).....	129
Figura 33. Perfil de liberação do MJ nos sistemas com proporções crescentes de fase tensoativo (F: 6%, G: 10%, H: 15%, C: 20% e I: 25%) e fase oleosa constante (18%).....	130
Figura 34. Análise macroscópica do tumor evidenciando a massa tumoral desenvolvida próximo a pata e medição com paquímetro após a retirada do tumor. Animal tratado com o controle negativo (salina).....	136

- Figura 35.** Análise microscópica do tecido tumoral. No qual há presença de mitoses típicas e atípicas. As lâminas histológicas foram coradas com hematoxilina e eosina (H/E) e observadas em microscópio óptico comum sob aumento de 400x.....136
- Figura 36.** Análise microscópica do tecido tumoral, onde as setas apontam X da classificação MAGS: X possui um valor entre 0 e 5 indicando a aparência histológica das células endoteliais na zona de hiperplasia (0 = célula endotelial normal; 1 = célula aumentada, mas com núcleo normal e claro; 2 = célula aumentada, mas com núcleo claro e proeminente; 3 = célula com núcleo grande e hiper cromático; 4 = células endoteliais “bizarrras”; 5 = células que apresentem figura mitótica). As lâminas foram coradas com hematoxilina e eosina (H/E) e observadas em microscópio óptico comum sob aumento de 400x.....138
- Figura 37.** Análise microscópica tumoral onde fica evidente a presença de vasos sanguíneos. As lâminas foram coradas com hematoxilina e eosina (H/E) e observadas em microscópio óptico comum sob aumento de 400x.....139
- Figura 38.** Determinação da inibição do volume tumoral.....140
- Figura 39.** Determinação do grau de angiogênese dos tumores.....141

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Composição das formulações com variação da proporção de fase oleosa e formulações com variação da proporção de tensoativo na ausência e presença de MJ.....79

Tabela 2. Composição das formulações com proporção de MJ crescente.....80

Tabela 3. Composição das formulações com MJ como fase oleosa.....80

Tabela 4. Raio hidrodinâmico (Raio) das gotículas e índice de polidispersidade (Pld) das formulações com variação de proporção de fase oleosa e variação de proporção de tensoativo na ausência e na presença de MJ.....82

Tabela 5. Raio hidrodinâmico (Raio) das gotículas e índice de polidispersidade (Pld) das formulações com variação de MJ e das formulações em que MJ foi utilizado como fase oleosa.....83

Tabela 6. Comportamento de fluxo (n) e índice de consistência (K) para as formulações com variação na proporção de fase oleosa e formulações com variação na proporção de tensoativo, na presença e ausência de MJ.....93

Tabela 7. Comportamento de fluxo (n) e índice de consistência (K) para as formulações com variação na proporção de MJ e formulações com MJ utilizado como fase oleosa.....94

Tabela 8. Valores de q_{max} (Å) e razão entre as distâncias interplanares para as formulações com variação de fase oleosa e variação de tensoativo na ausência e presença de MJ.....111

Tabela 9. Valores de q_{max} (Å) e razão entre as distâncias interplanares para as formulações com variação de MJ ou formulações onde MJ foi utilizado como fase oleosa.....112

Tabela 10. Potencial Zeta das formulações com variação de fase oleosa e formulações com variação de tensoativo na ausência e presença de MJ.....	113
Tabela 11. Potencial Zeta das formulações com variação de MJ e das formulações onde MJ foi utilizado como fase oleosa.....	114
Tabela 12. Caracterização físico-química, aspecto visual e definição das formulações na ausência de MJ.....	120
Tabela 13. Caracterização físico-química, aspecto visual e definição das formulações na presença de MJ.....	121
Tabela 14. Caracterização físico-química, aspecto visual e definição das formulações com variação da proporção de MJ.....	122
Tabela 15. Caracterização físico-química, aspecto visual e definição das formulações contendo MJ como fase oleosa.....	123
Tabela 16. Constante de liberação (K) obtida através de cálculos de delta de concentração em um determinado intervalo de tempo.....	131
Tabela 17. R^2 obtido a partir dos dados da liberação <i>in vitro</i> das formulações a partir da equação de ordem zero.....	134
Tabela 18. Parâmetros tumorais após tratamento.....	143

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	21
2. OBJETIVOS	54
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	55
3.1. Materiais.....	55
3.1.2. Matérias-Primas, Reagentes e Solventes.....	55
3.1.3. Equipamentos.....	55
3.2. Métodos.....	57
3.2.1. Obtenção dos sais de ácido graxo a partir do óleo de coco.....	57
3.2.2. Preparação dos sistemas estabilizados por fosfatidilcolina de soja, sais de ácidos graxos e glicerol.....	58
3.2.3. Diagrama de fases para o sistema estabilizado por SAG/G/FS.....	58
3.2.4. Caracterização físico-química dos sistemas selecionados.....	59
3.2.5. Determinação do MJ em formulações por cromatografia gasosa acoplada ao detector por íon de chamas.....	63
3.2.6. Ensaio de Liberação <i>in vitro</i>	64
3.2.7. Avaliação da atividade antitumoral em TAE.....	65
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	71
5. CONCLUSÕES	145
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	147

1. INTRODUÇÃO

O câncer é uma doença de alta incidência em todo o mundo e tornou-se um grave problema de saúde pública. O grande problema dos antineoplásicos de maior ação terapêutica são os severos efeitos colaterais. A doxorubicina gera efeitos tóxicos cardíacos e renais além de mielossupressão (CHEN *et al.*, 2013), a cisplatina pode causar nefrotoxicidade (MÁTHÉ *et al.*, 2013) e o bevacizumabe pode causar perfurações gastrointestinais e hemorragia (ISLAM *et al.*, 2013). Para diminuir estes efeitos tóxicos há a necessidade de desenvolver sistemas capazes de incorporar estes fármacos e direcioná-los no organismo, de modo a evitar que atinjam outros tecidos reduzindo assim a toxicidade gerada pelos fármacos.

O metiljasmonato tem sido amplamente estudado devido a sua atividade antineoplásica já comprovada em câncer: gástrico (ZHENG *et al.*, 2013), no fígado (PARK *et al.*, 2012), cervical (MILROT *et al.*, 2012; KNIAZHANSKI *et al.*, 2008), mieloma múltiplo (KLIPPEL *et al.*, 2012), de mama (YERUVA *et al.*, 2008), melanoma (COHEN & FLESCHER 2009) e outros (FLESCHER 2007; FINGRUT & FLESCHER 2002).

A ação antitumoral do metiljasmonato pode ocorrer através de três mecanismos, simultaneamente ou isoladamente. O primeiro é o mecanismo bioenergético no qual o jasmonato induz uma severa depleção de ATP nas células cancerosas através da perturbação mitocondrial, além disso, o metiljasmonato tem a habilidade de separar a hexoquinase da mitocôndria. O segundo é o das espécies oxigênio-reativo no qual o jasmonato induz apoptose em células de câncer de pulmão através da geração de peróxido de hidrogênio e proteínas pro-apoptóticas da família Bcl-2. O terceiro mecanismo é a capacidade de re-diferenciação em células humanas de leucemia mielóide através da atividade da proteína quinase ativada por mitógenos (MAPK) e da atividade semelhante de citocininas isopenteniladenina (COHEN & FLESCHER 2009).

O metiljasmonato é uma ciclopentanona insolúvel em água e solúvel em álcool, óleos, cetona e hidrocarbonetos (FAO, 2010). Devido a sua característica hidrofóbica, há a necessidade de desenvolver um sistema nanocarreador que seja capaz de direcionar este fármaco no organismo atingindo o alvo, neste caso as células tumorais.

Os sistemas de liberação são formas farmacêuticas capazes de incorporar fármacos de acordo com as características do próprio fármaco, do transportador e do alvo que se pretende atingir. Devem ser considerados: a polaridade, afinidade e solubilidade do fármaco, as características destes transportadores: como direcionamento do fármaco, liberação controlada e/ou prolongada e as características do órgão, tecido ou células que deverão receber esse fármaco. Alguns sistemas de liberação que tem sido objeto de estudo são micro e nanoemulsões (SILVA *et al.*, 2013), lipossomas (MUFAMADI *et al.*, 2013) nanopartículas poliméricas (nanocápsulas e nanoesferas) (SANTOS & BUSS, 2013) e nanopartículas lipídicas (nanopartículas lipídicas sólidas e carreadores lipídicos nanoestruturados) (SINGH *et al.*, 2012).

Microemulsões são sistemas compostos por duas fases: aquosa e oleosa, uma destas fases está dispersa no interior da outra fase na forma de gotículas. Essas gotículas são da ordem de nanômetros. Este sistema é isotrópico, transparente e estável do ponto de vista termodinâmico (FORMARIZ *et al.*, 2005; OLIVEIRA *et al.*, 2004).

As nanoemulsões apresentam a mesma composição das microemulsões, o que as diferencia seria o fato de as nanoemulsões serem semi-opacas, devido ao diâmetro das gotículas ser maior que das microemulsões, e não estáveis termodinamicamente, enquanto as microemulsões são transparentes e estáveis do ponto de vista termodinâmico (ABOOFAZELI, 2010).

As micro e nanoemulsões podem ter orientação óleo em água ou água em óleo. Para incorporar o metildiidrojasmonato, fármaco com características lipofílicas, foram

desenvolvidas micro e nanoemulsões óleo em água e o fármaco foi incorporado na fase interna oleosa. Sendo assim, com a fase externa aquosa e dimensão reduzida da fase interna, estas formulações podem ser administradas através da via intravenosa, rota de administração comum para os quimioterápicos.

1.1. Câncer

A palavra câncer vem do grego *karkínos* que significa caranguejo e foi utilizada pela primeira vez por Hipócrates, o pai da medicina que viveu entre 460 e 377 a.C. Esta doença foi detectada em múmias egípcias há mais de 3 mil anos a.C. Atualmente, câncer é o nome geral dado a um conjunto de mais de 100 doenças, que têm em comum o crescimento desordenado de células, que tendem a invadir tecidos e órgãos vizinhos.

A proliferação celular pode ser controlada, como na hiperplasia, metaplasia e displasia, ou pode ser não controlada como nas neoplasias (câncer *in situ* e câncer invasivo) que, na prática, são denominadas tumores. As neoplasias podem ser benignas ou malignas. As neoplasias benignas ou tumores benignos têm seu crescimento de forma organizada, geralmente lento, expansivo e apresentam limites bem nítidos. Apesar de não invadirem os tecidos vizinhos, podem comprimir os órgãos e tecidos adjacentes, são exemplos de tumores benignos: lipoma, mioma e adenoma. As neoplasias malignas ou tumores malignos manifestam com um maior grau de autonomia e são capazes de invadir tecidos vizinhos e provocar metástases, podendo ser resistentes ao tratamento e causar a morte do indivíduo. O câncer é uma neoplasia maligna e a capacidade invasiva das neoplasias malignas é a principal responsável pela dificuldade da erradicação por processos cirúrgicos das mesmas (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2011).

Entre as doenças atuais, as neoplasias têm sido apontadas como uma das maiores causas de morte da humanidade e, ainda, esse perfil coloca as neoplasias como um sério problema de saúde pública no mundo (NOVAES e BEAL, 2004). No Brasil o câncer é a segunda causa de morte e vem sendo indicada nos inquéritos epidemiológicos como causa *mortis* muito freqüentes em nosso país. Atualmente, o câncer é um dos problemas de saúde pública mais complexos que o sistema de saúde brasileiro enfrenta, dada a sua magnitude epidemiológica, social e econômica. Por outro lado, pelo menos um terço dos casos novos de câncer que ocorre anualmente no mundo poderia ser prevenido. Os tipos de câncer mais incidentes na população brasileira são: da cavidade oral, cólon e reto, esôfago, estômago, mama, pele, próstata, pulmão, colo do útero e leucemias. A incidência varia de acordo com a localização primária do tumor, com o sexo do indivíduo, com a faixa etária, com a região geográfica que ele vive e com a condição sócio-econômica que ele se encontra (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2011).

Devido ao crescente número de casos de neoplasias, pesquisas são realizadas com o objetivo de encontrar novos compostos com ação antineoplásica. Apesar de existirem inúmeros compostos naturais e sintéticos para o tratamento de neoplasias, cada tipo de tumor apresenta particularidades biológicas capazes de desenvolver mecanismos intracelulares de resistência farmacológica (de etiologia multifatorial) aos quimioterápicos (GOMES & MILANEZ, 1997). Além disso, os antineoplásicos muito utilizados como doxorrubicina, bevacizumabe e cisplatina, por exemplo, podem promover efeitos colaterais graves (CHEN *et al.*, 2013; ISLAM *et al.*, 2013; MÁTHÉ *et al.*, 2013).

Com base nos efeitos colaterais graves e/ou resistência aos quimioterápicos, metodologias para o desenvolvimento de novos fármacos antitumorais vêm sendo extensamente aprimoradas, assim como as tecnologias para a otimização do efeito farmacológico dos fármacos já existentes, mas que têm seu uso limitado devido aos efeitos

colaterais severos ou propriedades biofarmacotécnicas inadequadas. Sistemas nanoestruturados têm sido à base das pesquisas de antineoplásicos descobertos recentemente com o objetivo de obter maior eficácia e menor toxicidade permitindo não apenas o aumento da concentração de fármaco no sítio de ação desejado, mas também a redução dos efeitos colaterais. A pesquisa de sistemas nanoestruturados também tem como objetivo a utilização dos fármacos já existentes, com a mesma intenção de reduzir efeitos colaterais e direcionar o fármaco no organismo (FORMARIZ *et al.*, 2004).

Existem tumores de crescimento rápido, como as leucemias e os linfomas, e os tumores de crescimento lento que são os tumores sólidos. É conhecido que a quimioterapia apresenta maior eficácia nos tumores relacionados com o sistema hematopoiético, já os tumores sólidos apresentam poucas alternativas de tratamento. O Instituto Nacional do Câncer dos Estados Unidos desenvolveu um painel de células cancerígenas que conta com 60 linhagens originadas de oito tipos de tumores sólidos (pulmão, melanoma, mama, rim, cólon, próstata, ovário e cérebro) e do sistema hematopoiético (leucemia) o que permite à avaliação “*in vitro*” da atividade antiproliferativa de fármacos antineoplásicos com rapidez e eficiência. Resultados rápidos são obtidos sobre a atividade de novas substâncias testadas (MONKS *et al.*, 1991).

Os animais desenvolvem o câncer por mecanismos semelhantes aos humanos. Existem tumores que se desenvolvem espontaneamente em animais de laboratório, principalmente em roedores. Esse fato é muito importante para avaliação da atividade antitumoral *in vivo*, devido a não utilização de agentes químicos e físicos, localização superficial, similaridade com tumores humanos, rápida evolução, fácil reprodução através de transplantes e variadas possibilidades de diferentes abordagens experimentais, sejam métricas ou paramétricas (YOUNG & HALLOWEA, 1973).

O tumor de Ehrlich foi descoberto por Ehrlich e descrito em 1906, como adenocarcinoma mamário de camundongos fêmeas. O tumor foi desenvolvido no início sob a forma sólida, porém em 1932 Loewenthal e Jahn sugeriram a forma ascítica que é desenvolvida no peritônio de animais inoculados com células tumorais (SILVA *et al.*, 2004).

Para induzir essa neoplasia em camundongos é necessário o transplante das células tumorais de um camundongo com a neoplasia para um sadio. O líquido ascítico de camundongos Swiss deve ser retirado dos camundongos com a neoplasia e inoculado no peritônio do receptor para o desenvolvimento da forma ascítica ou este líquido é inoculado de forma subcutânea ou no coxim plantar para o desenvolvimento do tumor sólido. No caso do desenvolvimento do tumor sólido, após a inoculação o tumor deve crescer entre sete e trinta dias. Com um tamanho tumoral pré-estabelecido, iniciam-se os tratamentos ou experimentos muito utilizados na Oncologia Experimental (DAGLI, 1989).

O tumor de Ehrlich é muito rico do ponto de vista histológico. Ele apresenta áreas de necrose, intensa atipia, células anaplásicas, células inflamatórias, inúmeras figuras mitóticas e outras células que indicam invasividade, além de novos vasos sanguíneos criados para nutrir o tumor. Por esta razão o estudo do tumor de Ehrlich auxilia na compreensão dos tumores malignos (DAGLI, 1989). Esta ferramenta possibilita a análise *in vivo* da atividade antitumoral de antineoplásicos novos a serem testados.

Tendo em vista que o modelo experimental de Ehrlich permite histologicamente à observação dos novos vasos sanguíneos, pode-se através deste modelo verificar não somente a atividade do antineoplásico, mas também se este será capaz de inibir a vascularização criada para nutri-lo. A angiogênese dos tumores tem sido amplamente estudada. Terapias anti-angiogênicas são desenvolvidas em associação a antitumorais como estratégia para controlar o câncer, como mostra o estudo de TAKARA *et al.*, 2012. Neste estudo foram desenvolvidos lipossomas com alvo específico para CD-13, responsável pela

neovascularização em células de câncer renal. Os lipossomas incorporaram doxorubicina, um antineoplásico clássico, e esta associação lipossomal cessou o crescimento tumoral devido à indução do rompimento dos vasos tumorais.

1.2. Antineoplásicos e vias de administração

Para tratar os diversos tipos de câncer existem três formas principais de tratamento: quimioterapia, cirurgia e radioterapia. Na maioria das vezes esses tratamentos não estão isolados, podendo ocorrer associação entre eles para obter maior sucesso na eliminação do câncer. O principal objetivo da quimioterapia é eliminar as células com câncer e manter as células normais intactas. Porém na maioria das vezes as células normais são atingidas gerando os efeitos colaterais, como: náuseas, perda de cabelo e baixa imunidade (ALMEIDA *et al.*, 2005).

CHABNER E CALABRESI em 1995, classificaram os antineoplásicos, de acordo com seu mecanismo de ação. Dentre eles destacam-se: os antimetabólitos (Metotrexato, Fluorouracil, Floxuridina, Citarabina, Mercaptopurina, Tioguanina), os antagonistas purínicos que inibem a síntese purínica, a dactomicina e seus derivados que intercalam no DNA e inibem RNA polimerase, os agentes alquilantes (mostardas nitrogenadas, nitrossuréias, triazenos, alquil sulfonatos) que formam derivados com o DNA, a hidroxiuréia que inibe ribonucleosídeo redutase e inibe a biosíntese pirimidínica, enzimas que inibem síntese proteica e alcalóides (vimblastina, vincristina) e taxóis (paclitaxel) que inibem polimerização de microtúbulos. Existem também os complexos de coordenação da platina (cisplatina e carboplatina) que alquilam o DNA inibindo a síntese deste e os antibióticos naturais (doxorubicina, daunorubicina, dactinomicina, mitomicina) que intercalam o DNA. Cada um destes agentes pode agir em determinada fase do ciclo celular (fármacos ciclo-celular

específicos) ou independente das células tumorais estarem atravessando o ciclo celular ou estarem em repouso (fármacos ciclo-celular não específicos) (ALMEIDA *et al.*, 2005).

Independente dos antineoplásicos serem praticamente heterogêneos, devido a diversidade de características químicas e mecanismos farmacológicos (ALMEIDA *et al.*, 2005) a quimioterapia ocorre quase sempre da mesma forma, através da administração intravenosa, sendo que esta administração pode ser periférica ou central (REIS *et al.*, 2008; VÍLLARIN *et al.*, 2003). Os fármacos comuns de administração intravenosa, como: doxorrubicina, cisplatina, ciclofosfamida, 5-flourouracilo, metotrexato, taxol, vinblatina, vincristina, são diluídos em soro fisiológico antes de serem administrados (VÍLLARIN *et al.*, 2003).

Além da administração intravenosa, a quimioterapia pode ser realizada através da via oral, intramuscular, subcutânea, intraperitoneal, intra-pleural, intra-tecal, intra-retal, intra-arterial, intravesical e aplicação tópica. Entretanto, a via intravenosa é considerada a via mais segura em relação à absorção e manutenção do nível sérico do fármaco (REIS *et al.*, 2008).

1.3. Jasmonatos e derivados

Os jasmonatos são hormônios vegetais produzidos e liberados durante uma situação de estresse vegetal como radiação ultravioleta, choque osmótico, drogas citotóxicas, aquecimento, etc. (FINGRUT & FLESCHER, 2002). Os jasmonatos são compostos que contém o anel ciclopentanona em sua estrutura molecular, dentre eles destacam-se o ácido jasmônico (AJ), o metiljasmonato, o cis-jasmone e o metildiidrojasmonato (MJ) (Fig.1). O metiljasmonato induz um inibidor de proteínas: proteínase, que acumula em baixas concentrações em resposta a uma lesão ou a um ataque patogênico (FARMER & RYAN,

1990). O metildiidrojasmonato tem sido utilizado em diversos estudos por apresentar atividade antineoplásica semelhante ao metiljasmonato.

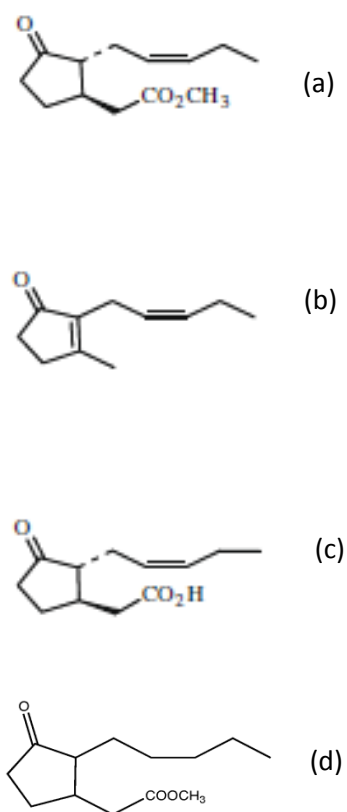


Figura 1: Estrutura química dos derivados do jasmonato, metiljasmonato (a), cis-jasmone (b), ácido jasmônico (c) e metildiidrojasmonato (d).

O metiljasmonato é um éster, metil 3-oxo-2-penta-2-enil-1-ciclopentilacetato de densidade 0,998 g/mL a 25 °C (SIGMA-ALDRICH CO., 2010), líquido incolor a amarelo com odor doce de flores herbáceas. É insolúvel em água e solúvel em óleos, cetona, álcool e hidrocarbonetos (FAO, 2010). Sua estrutura pode ser degradada por esterases metabólicas, o que pode ser um fator limitante para sua atividade *in vivo*.

Os jasmonatos já têm sido objeto de patente para uma grande variedade de usos em crescimento e indutor de síntese de compostos vegetais. A síntese dos jasmonatos ocorre a partir do ácido linolênico através de uma rota enzimática, a rota da lipoxigenase, um processo que envolve a transformação de ácido linoléico pela lipoxigenase em ácido 13-hidroperoxilinoléico, depois em ácido jasmônico, que é finalmente convertido em metiljasmonato (PARK *et al.*, 2012)

A rota enzimática da lipoxigenase é uma rota análoga à produção de prostaglandinas: a liberação do ácido araquidônico a partir da ativação de fosfolipases de membrana resulta na síntese de eicosanóides como as prostaglandinas das séries A e J, que contém em sua estrutura um anel ciclopentanona, que são potentes inibidores da proliferação “*in vitro*” e são supressores da tumorigenicidade “*in vivo*” (NEEDLEMAN *et al.*, 1986; D’ONOFRIO *et al.*, 1992; GOROSPE *et al.*, 1996; FINGRUT & FLESCHER, 2002). Os jasmonatos também são potentes inibidores da proliferação “*in vitro*” e são supressores da tumorigenicidade “*in vivo*” (NEEDLEMAN *et al.*, 1986; D’ONOFRIO *et al.*, 1992; GOROSPE *et al.*, 1996), como já demonstrado pelas patentes de Flescher (FINGRUT & FLESCHER, 2002; ROTEM *et al.*, 2005).

Os jasmonatos apresentam eficácia em diversos tipos de tumores em crescimento através de seletividade citotóxica em células transformadas (ELIA & FLESCHER, 2008; FLESCHER 2007, GOLDIN *et al.*, 2007, HEYFETS & FLESCHER, 2007) e também são capazes de matar células com câncer de uma maneira independente da transcrição, da tradução de proteínas e da expressão de p53 (GOLDIN *et al.*, 2007, HEYFETS & FLESCHER., 2007; ROTEM *et al.*, 2005).

Existem três mecanismos para explicar a supressão do crescimento de células cancerosas pelo jasmonato, porém esses mecanismos não estão completamente elucidados. Os diferentes mecanismos de ação dos jasmonatos não são mutuamente exclusivos e podem

ocorrer concomitantemente, afetando diferentes tipos de câncer ou serem ativos em diferentes tempos e séries de concentrações:

(1) os jasmonatos podem causar perturbação mitocondrial, tanto em células cancerosas intactas como em mitocôndrias isoladas destas, gerando uma severa depleção de ATP e conseqüente morte destas células. O metiljasmonato age nas células com câncer através da abertura anormal do complexo poro de transição de permeabilidade mitocondrial. Esta ação é conhecida como mecanismo bioenergético, em que células humanas normais não são afetadas pelo metiljasmonato, demonstrando uma seletividade dos jasmonatos pelas células cancerosas (FLESCHER *et al.*, 2007; ROTEM *et al.*, 2005). Esta seletividade é demonstrada quando o metiljasmonato entra em contato com células de leucemia e hepatoma ou quando entra em contato com mitocôndrias isoladas destas, o metiljasmonato é capaz de gerar perturbação mitocondrial nesta situação, porém, quando em contato com fibroblastos 3T3 não-transformados as células não são afetadas. Este fato mostra que as mitocôndrias das células com câncer, ou seja, células transformadas possuem características específicas que as tornam sensíveis aos efeitos citotóxicos dos jasmonatos (FLESCHER, 2007).

(2) Outra estratégia do jasmonato é normalizar as células com câncer, já que estas são indiferenciadas. A re-diferenciação é um processo em que o programa genético das células com câncer é modificado de modo a trazer um genótipo e um fenótipo mais diferenciado. Este mecanismo é conhecido como indução de re-diferenciação (FLESCHER, 2007). Diversas linhagens tumorais foram testadas na presença de metiljasmonato e as células leucêmicas foram mais sensíveis que as células de tumores sólidos e dentre as células leucêmicas a células de leucemia mielóide humana (HL-60) foram as mais sensíveis. O metiljasmonato induz a ativação da proteína quinase ativada por mitógeno (MAPK) o que permite re-diferenciar as células de leucemia mielóide humana (ISHII *et al.*, 2004).

(3) O metiljasmonato também pode se envolver com espécies de oxigênio reativo (ROS) induzindo apoptose em células de câncer de pulmão através da geração de peróxido de hidrogênio e proteínas pró-apoptóticas da família Bcl-2. Este terceiro modo de ação dos jasmonatos é conhecido como mecanismo mediador de espécies de oxigênio reativo (EZEKWUDO *et al.*, 2008; FLESCHER, 2007). Em células de adenocarcinoma de pulmão humano (A549) o metiljasmonato induziu apoptose através da condensação e fragmentação do DNA e ativação da caspase 3 (KIM *et al.*, 2004).

Enquanto o mecanismo bioenergético e o mediador de espécies de oxigênio reativo estão associados a apoptose celular, o mecanismo de re-diferenciação está relacionado com a supressão da proliferação celular (FLESCHER, 2007).

A toxicidade aguda do MJ foi previamente verificada em estudos anteriores (SILVA, 2010). Diferentes doses de MJ foram testadas através da administração intraperitoneal em camundongos. As doses de MJ livre e de MJ incorporado em microemulsão foram de 70, 140, 280 e 350 mg/Kg. Em nenhuma destas doses houve morte dos animais, indicando que o MJ não apresenta toxicidade até a dose de 350 mg/Kg, o que é de real importância, já que na dose de 70 mg/Kg a doxorubicina é letal para ratos e camundongos (FORMARIZ, 2008).

Não existe no mercado um medicamento contendo o MJ e, na literatura, os estudos que verificam a atividade antineoplásica deste fármaco, utilizam apenas uma solução do fármaco em etanol para experimentos *in vitro* (MILROT *et al.*, 2013; MILROT *et al.*, 2012; DAVIES *et al.*, 2009), um outro estudo utiliza uma solução de MJ em óleo vegetal para experimentos *in vivo* (KLIPPEL *et al.*, 2012), ou simplesmente não citam como o MJ foi preparado para ser testado (KNIAZHANSKI *et al.*, 2008), portanto não foram desenvolvidos sistemas capazes de transportar o MJ no organismo de forma seletiva. Porém testar a atividade do MJ em etanol ou óleo não é algo que se possa simular a administração *in vivo*,

pois seria inviável administrar etanol ou óleo diretamente através da via intravenosa, por exemplo.

1.4 Microemulsões e Nanoemulsões

Devido à comprovada atividade antineoplásica do MJ, há a necessidade de desenvolver um sistema nanocarreador para este fármaco alcançar as células tumorais e tendo em vista sua insolubilidade em água e solubilidade em óleo ele necessita de um sistema que o incorpore direcionando-o no organismo, de modo que a administração intravenosa seja possível, tendo em vista que é a via mais comum e segura para quimioterapia.

Diferentes sistemas nanoestruturados estão surgindo com o objetivo de controlar a liberação de fármacos, modular a velocidade com que estes atravessam as barreiras biológicas, penetrar na circulação sistêmica e atingir o alvo farmacológico. Dessa maneira os sistemas nanoestruturados são capazes de direcionar o fármaco no organismo evitando seu acúmulo em tecidos não específicos, onde pode ser potencialmente tóxico e elevando sua concentração no local em que deve exercer seu efeito farmacológico (OLIVEIRA *et al.*, 2004; OLIVEIRA & SCARPA, 2001;).

Estes nanocarreadores coloidais têm a propriedade para liberar o fármaco no sítio de ação desejado (célula, tecido ou órgão), minimizar os efeitos colaterais que habitualmente existem nas formas farmacêuticas convencionais. Com o uso desses vetores nanoestruturados, nos tratamentos com antineoplásicos tem se conseguido o aumento da sua atividade antineoplásica e a diminuição dos efeitos tóxicos dos quimioterápicos (FORMARIZ *et al.*, 2006; 2007; RODRIGUES *et al.*, 2002; GIBAUD *et al.*, 1996).

As microemulsões têm sido amplamente estudadas para veiculação de fármacos antineoplásicos (paclitaxel, carmustina, metrotexato, daunorrubicina e doxorrubicina), por ser

um sistema nanoestruturado com resultados promissores (DORLHIAC-LAACER *et al.*, 2001; RODRIGUES *et al.*, 2002; MARANHÃO *et al.*, 2002, FORMARIZ *et al.*, 2007). As microemulsões são sistemas isotrópicos e transparentes compostos por dois líquidos imiscíveis geralmente água e óleo, estabilizados termodinamicamente pelo uso de tensoativos e co-tensoativos, localizados na interface óleo/água (FRIBERG & BOTHOREL, 1988; CONSTANTINIDES *et al.*, 1994; 1995; 1996; LAWRENCE, 2000; OLIVEIRA *et al.*, 1997; DALMORA & OLIVEIRA, 1999; DALMORA *et al.*, 2001; CORREA *et al.*, 2005; FORMARIZ *et al.*, 2005; 2006; 2008). A orientação para sistemas O/A ou A/O é dependente das propriedades físico-químicas do tensoativo e da relação entre as proporções de tensoativo e co-tensoativo (CONSTANTINIDES *et al.*, 1994; OLIVEIRA *et al.*, 2004).

As nanoemulsões são definidas por ABOOFAZELI, 2010 como formulações não estáveis termodinamicamente, com diâmetro de gotículas entre 200 e 500nm, o que as tornam translúcidas ou semi-opacas, independente do método de preparação. Também são chamadas de miniemulsões, emulsões submicron, emulsões ultrafinas ou emulsões finas dispersas. São isotrópicas e compostas por óleo, tensoativos, co-tensoativos e água. Como são sistemas não-equilibrados têm uma tendência espontânea de separar as fases. No entanto, elas podem possuir uma relativa estabilidade cinética por um longo período, ao contrário das microemulsões que são termodinamicamente estáveis. Como as nanoemulsões não são formadas espontaneamente requerem consequentemente energia externa para sua formação.

Outros autores, como TAMILVANAN, 2004, também classificam as nanoemulsões como sistemas termodinamicamente instáveis e compostos por duas fases, porém a influência ou não do modo de preparo nestas formulações diferencia a definição de ABOOFAZELI, 2010 e TAMILVANAN, 2004, pois estes últimos autores acreditam que as gotículas das nanoemulsões sejam extremamente pequenas devido aos métodos físicos de preparo como, por exemplo, por alta pressão.

O diâmetro das gotículas de uma microemulsão é aceitável em torno de 100 nm, enquanto de uma nanoemulsão o diâmetro das gotículas pode chegar até 500nm, sendo mais comum nanoemulsões com gotículas em torno de 200nm. Além disso, as nanoemulsões são mais opacas não apresentando estabilidade termodinâmica, apenas uma maior estabilidade cinética quando às comparamos a uma microemulsão (ABOOFAZELI, 2010).

A principal característica das ME e NE é formar uma emulsão muito fina por homogeneização suave com fase aquosa, cujas dimensões das gotículas da fase interna é da ordem de nanômetros. As ME e NE são superiores às soluções micelares em termos de potencial de solubilização de substâncias, por isso, são usadas para aumentar a solubilização e a absorção de fármacos lipofílicos. A estabilidade termodinâmica das ME oferece vantagens sobre as dispersões instáveis, tais como as suspensões e emulsões, possuindo tempo de vida útil muito mais amplo (ABOOFAZELI, 2010; CONSTANTINIDES, 1995; OLIVEIRA *et al.*, 1997; FORMARIZ *et al.*, 2005; 2006; NARANG *et al.*, 2007).

A ausência ou presença da estabilidade termodinâmica é uma das principais diferenças entre as ME e NE. A estabilidade termodinâmica em dispersões coloidais é determinada pela diferença de energia livre da dispersão com a energia livre das fases óleo e água separadas. Em uma nanoemulsão a energia livre da dispersão coloidal é mais alta do que a energia livre das fases separadas, o que significa que a nanoemulsão é instável do ponto de vista termodinâmico. Já em uma microemulsão, a energia livre da dispersão coloidal é mais baixa do que a energia livre quando as fases estão separadas. A variação de energia livre associada à formação de dispersões coloidais a partir de fases separadas consiste de uma variação de energia livre interfacial (ΔG_1) e uma variação de entropia ($- T\Delta S$):

$$\Delta G = \Delta G_1 - T\Delta S$$

Equação 1

A variação de energia livre interfacial (ΔG) é igual ao aumento da área de contato (ΔA) entre a fase aquosa e oleosa multiplicada pela tensão interfacial (γ) da interface óleo-água:

$$\Delta G_1 = \gamma \cdot \Delta A$$

Equação 2

A energia livre interfacial (ΔG_1) é sempre positiva porque o aumento da área de contato e a tensão interfacial são sempre positivos, este fato se opõe a formação das dispersões coloidais, enquanto que a entropia por ser sempre negativa, favorece a formação da dispersão coloidal. A formação de uma ME ou uma NE depende da quantidade de óleo e quantidade de tensoativo. As moléculas de óleo são incorporadas nas micelas de tensoativo até que as micelas tornem-se saturadas levando a formação de uma microemulsão. A adição de mais moléculas de óleo induzirá a separação de uma fase oleosa, o que pode resultar na formação de uma camada de óleo na parte superior da solução saturada de tensoativos ou pode ser distribuído como gotículas de óleo (nanoemulsões ou emulsões) dentro uma solução de tensoativos se suficiente energia for aplicada (McCLEMENTS, 2012).

ME O/A são frequentemente utilizadas para administração de fármacos lipofílicos, usualmente dissolvidas na fase oleosa (OLIVEIRA *et al.*, 2009). Devido à biocompatibilidade e estabilidade termodinâmica, a ME com fase interna de diâmetro na ordem de submicron pode ser usada para administração intravenosa (I.V.) (FORMARIZ *et al.*, 2006, 2008; PESTANA *et al.*, 2008). As nanoemulsões lipídicas O/A já são utilizadas há mais de 40 anos como fonte de calorias e ácidos graxos essenciais e nos últimos anos tem sido usadas como sistema de liberação de fármacos (BRUXEL *et al.*, 2012).

Para aplicações farmacêuticas é muito comum a adição de componentes como co-tensoativos, polímeros hidrofílicos com diferentes finalidades, e especialmente fármacos tem sido adicionados as ME (OLIVEIRA *et al.*, 2009).

O sistema micelar foi utilizado neste trabalho com o objetivo de comparar a liberação do fármaco a partir das ME e NE com a liberação do MJ a partir de uma solução. Porém, como o MJ é insolúvel em água houve a necessidade de acrescentar um tensoativo a esta solução de modo a solubiliza-lo, formando, um sistema micelar. Uma micela é um conjunto de tensoativos que se agregam espontaneamente na presença de água, formando geralmente, uma vesícula esférica. Neste caso, esta vesícula pode incorporar fármacos hidrofóbicos (HUSSEINI & PITT, 2008). Tanto as micelas quanto as ME e NE O/A são utilizadas para formar dispersões capazes de incorporar fármacos hidrofóbicos (NARANG *et al.*, 2007).

Quando os tensoativos estão abaixo da concentração micelar crítica (CMC) eles são capazes de aumentar a solubilidade do fármaco, fornecendo sua porção lipofílica para interações hidrofóbicas com o fármaco em solução. Acima da CMC, os tensoativos se auto-agregam para formar micelas com um núcleo hidrofóbico e uma superfície hidrofílica. O núcleo hidrofóbico melhora a retenção de fármaco, aumentando assim a sua solubilidade. Na presença de uma quantidade significativa de óleo, os tensoativos se concentram na interface óleo/água formando emulsões, em que o fármaco é solubilizado na fase oleosa interna. Quando o teor de óleo é baixo, rapidamente as gotículas são formadas com os tensoativos em sua interface definindo uma ME. As microemulsões diferem de micelas devido à presença de óleo. Além disso, as microemulsões muitas vezes requerem um co-tensoativo para facilitar sua formação. (NARANG *et al.*, 2007). O fato das ME e NE O/A apresentarem uma capacidade de solubilização maior que a da solução micelar permite que o fármaco incorporado permaneça por mais tempo e mais retido nas gotículas dos sistemas emulsionados do que na vesícula esférica de uma micela.

Com base nos conceitos apresentados e experiências relatadas, as micro e nanoemulsões O/A, sistemas nanoestruturados, podem incorporar o MJ em seu interior oleoso, tendo então uma fase aquosa externa o que possibilita uma administração intravenosa para este composto.

1.5. Design das formulações

Além do fármaco, uma microemulsão ou nanoemulsão necessita de adjuvantes técnicos que contribuem para formar um sistema nanoestruturado ideal com estabilidade adequada e necessita estar de acordo com as características relacionadas com a doença do paciente, com a via de administração e com o próprio fármaco. Na tentativa de desenvolver um sistema nanocarreador para o metiljasmonato, foi avaliado o seguinte conjunto de tensoativos: fosfatidilcolina de soja, glicerol e sais de ácido graxo além da fase oleosa, o óleo de soja.

1.5.1. Fosfatidilcolina de soja

A fosfatidilcolina ou lecitina foi utilizada como tensoativo nas formulações estudadas. A lecitina é muito utilizada como adjuvante farmacotécnico em comprimidos, preparações tópicas vaginal ou retal, suspensões, cápsulas, formulações intravenosas e intramusculares e preparações para uso inalatório (ROWE *et al.*, 2006).

A fosfatidilcolina é um tensoativo natural que se difunde na interface óleo-água. Funcionalmente tem como característica ser emoliente, emulsificante e solubilizante. Pode ser utilizada em preparações farmacêuticas injetáveis (intramuscular e intravenosa), formulações para nutrição parenteral, produtos tópicos e alimentícios. O equilíbrio hidrófilo-

lipófilo EHL da fosfatidilcolina está na faixa de 3-4. Estas são facilmente oxidadas e por essa razão devem ser estocadas em frascos bem fechados e protegidos da luz, além disso, se decompõem em valores de pH extremos (ROWE *et al.*, 2006).

A fosfatidilcolina (Figura 2) apresenta em sua estrutura duas longas cadeias de hidrocarbonetos, o que explica sua hidrofobia. Mas também possui cabeça de grupos zwitteriônicos polares, os quais têm momento dipolo, explicando sua forte hidrofília. Apesar desse equilíbrio hidrofílico e lipofílico, a fosfatidilcolina é lipofílica demais para conseguir formar espontaneamente a camada lipídica necessária, de tensão interfacial próxima de zero, para a formação de uma microemulsão. Portanto, há a necessidade de um co-tensioativo, como alcoóis de cadeia curta, para a formação das microemulsões (PARK *et al.*, 1999).

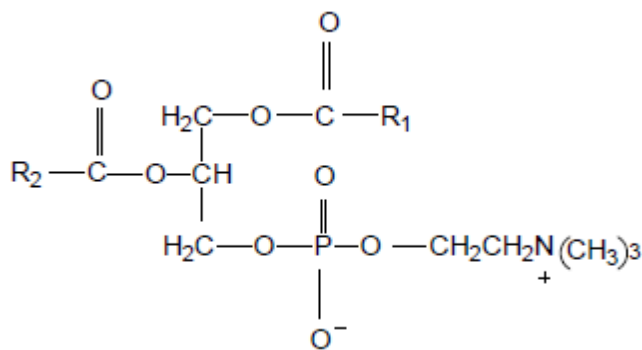


Figura 2: Estrutura química da fosfatidilcolina, onde R1 e R2 são ácidos graxos variáveis.

1.5.2. Glicerol

O glicerol foi utilizado como co-tensioativo, tendo em vista que se trata de um álcool de cadeia curta. Quimicamente o glicerol é um tri-álcool com três carbonos, tendo como

nome sistemático (IUPAC) 1,2,3-propanotriol (Figura 3), é um líquido incolor, com gosto adocicado, sem cheiro e muito viscoso, derivado de fontes naturais ou petroquímica. O nome glicerol deriva da palavra grega *glykys*, doce. Apresenta massa molecular de 92,09382 g/mol, densidade 1,261 g/cm³, viscosidade de 1,5 Pa.s, ponto de fusão 18,2°C, ponto de ebulição 290°C, calorías 4,32 kcal/g e tensão superficial 64,00 mN/m.

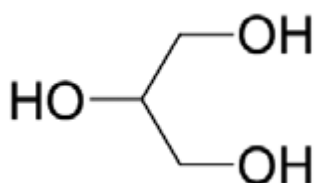


Figura 3. Estrutura química do glicerol.

A presença de três grupos hidroxila na estrutura do glicerol é responsável pela solubilidade em água e sua natureza hidrofílica. É uma molécula altamente flexível formando ligações de hidrogênio tanto intra como intermoleculares (BEATRIZ *et al.*, 2011). Através do método de Davies, com a Equação: $EHL = 7 + \sum (\text{grupos hidrofílicos}) - \sum (\text{grupos lipofílicos})$, sabe-se que o EHL do glicerol = 11,275, já que o glicerol é um tensoativo de estrutura química definida.

1.5.3. Sais de ácidos graxos

Os sais de ácidos graxos (SAG) são compostos utilizados como tensoativo. Os ácidos graxos são classificados pelo comprimento das cadeias carbônicas. Os ácidos graxos de cadeia média contém de 6 a 12 carbonos saturados e são encontrados facilmente nos

derivados do leite, principalmente no leite de cabra, cuja espécie emprestou seu prefixo para denominação de alguns destes compostos como o ácido caprótico (6C), o ácido caprílico (8C) e o ácido cáprico (10C) (TREVIZAN, 2009). Além destes, o ácido láurico (12C) também é um ácido graxo de cadeia média. Já os ácidos graxos de cadeia longa são aqueles com mais de 14 carbonos, como o mirístico (14C), palmítico (16C), esteárico (18C), oléico (18:1) e linoléico (18:2).

Os sais de ácido graxo empregados foram extraídos do óleo de coco. O óleo de coco ou gordura de coco é um óleo comestível obtido do fruto de Cocos nucifera (coco) através de processos tecnológicos adequados. Apresenta densidade relativa de 0,908-0,921, índice de refração de 1,448-1,450, índice de saponificação de 248 a 265, índice de iodo de 6 -11 e índice de peróxido de no máximo 10. A composição do óleo de coco em ácidos graxos, saturados: caprótico (0,4 a 0,6%), caprílico (5,0 a 10,0 %), cáprico (4,5 a 8,0%), láurico (43,0 a 51,0%), mirístico (16,0 a 21,0%), palmítico (7,5 a 10,0%), esteárico (2,0 a 4,0%), mono-insaturados: oleico (5,0 a 10,0%), poli-insaturados: linoléico (1,0 a 2,5%) e outros (<0,5%), o ácido láurico é que está em maior porcentagem no óleo de coco (BRASIL, 2012a).

Através da reação de saponificação (extração do óleo de coco, ou de diversos outros tipos de óleo) como mostra a Figura 4, é possível obter sais de ácido graxo. Os triglicerídeos de cadeia média (TCM) são três ácidos graxos unidos a uma molécula de glicerol. Como resultado desta reação obtém-se os sais sódicos de ácido graxo (Figura 5), como o laurato de sódio proveniente do ácido láurico reagindo com hidróxido de sódio.

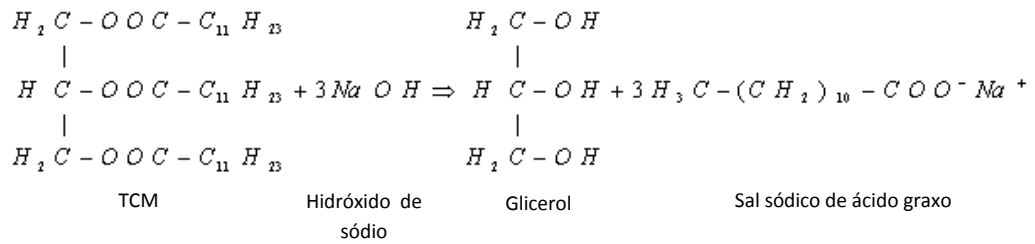


Figura 4. Reação de saponificação (SANTOS *et al.*, 2007).

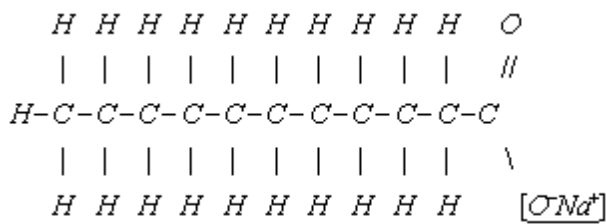


Figura 5. Estrutura química do laurato de sódio (SANTOS *et al.*, 2007).

Os sais de ácido graxo obtidos da reação de saponificação apresentam uma porção lipofílica devido à cadeia média ou longa de carbonos e uma porção hidrofílica devido ao sal formado. Com base no método de Davies, foi determinado o EHL aproximado para o conjunto de sais de ácidos graxos formados a partir da reação de saponificação, baseado em uma concentração média de seus respectivos ácido graxos contidos no óleo de coco. O EHL obtido determinado foi 20,4.

1.5.4. Óleo de soja

O óleo de soja foi utilizado neste trabalho como fase oleosa das formulações e este triglicerídeo de cadeia longa (TCL) tem sido usado extensivamente no preparo de emulsões parenterais, assim como óleo de rícino e óleo de oliva (BRUXEL *et al.*, 2012). As microemulsões e nanoemulsões lipídicas necessitam de uma fase oleosa para incorporar o fármaco no interior das gotículas oleosas, tendo em vista que o metiljasmonato apresenta características em sua maior parte lipofílicas. Entende-se por óleo de soja, o produto obtido por prensagem mecânica e/ou extração por solvente, dos grãos de soja isento de misturas de outros óleos, gorduras ou outras matérias estranhas ao produto, e que tenha as seguintes características de identidade e composição em ácidos graxos (BRASIL, 2012b).

As características de identidade do óleo de soja: densidade relativa à 25 C: 0,914 a 0,922, índice de refração a 25 C: 1.4700 a 1.4760, índice de iodo: 120 a 143, índice de saponificação 189 a 198.

A composição do óleo de soja em ácidos graxos: saturados: mirístico: traços, palmítico: 9,0 a 14,5%, esteárico: 2,5 a 5,0%, araquídico: traços, behênico: traços, lignocérico: traços; mono-insaturados: palmitoléico: traços, oléico: 18,0 a 34,0 %; poli-insaturados: linoléico: 45,0 a 60,0% e linolênico: 3,5 a 8,0% (BRASIL, 2012b).

A combinação de glicerina, lecitina, triglicerídeos de cadeia média e óleo de soja já existe em outros medicamentos (Celepid TCM-TCL 20% da Claris produtos farmacêuticos, Lipovenos TCM 10 ou 20% da Fresenius Kabi, Lipofundin TCM-TCL 20% da B. Braun). Todos estes são emulsões lipídicas de uso intravenoso utilizado para nutrição parenteral, indicados para pacientes com deficiência em manter ou restabelecer, por ingestão oral, um padrão normal de ácidos graxos essenciais. Além disso, é indicado para atender as

necessidades energéticas de pacientes, através da conversão rápida de ácidos graxos de cadeia média e de ácidos graxos essenciais na terapia nutricional parenteral.

Estudos recentes utilizaram óleos vegetais no preparo de formulações (SADECKA & SZELAG, 2013; CHEN *et al.*, 2012; ZHENG *et al.*, 2011; MENDONÇA *et al.*, 2009). SADECKA & SZELAG, 2013, utilizaram óleo de soja, de palma, de manga e manteiga de Shorea e observaram que ao preparar microemulsões, o óleo utilizado influenciou a estabilidade das formulações, tendo em vista que a mistura de tensoativos deve apresentar um EHL que esteja próximo do EHL exigido pela fase oleosa.

1.5.5. Diagrama pseudoternário de fases

Quando ocorre variação da proporção dos componentes de uma formulação podem surgir diferentes tipos de agregados como: microemulsões, emulsões, cristais líquidos ou até mesmo separação de fases. O diagrama ternário de fases é utilizado neste caso para verificar os diferentes tipos de agregados moleculares que podem ser formados. Este diagrama é constituído na forma de triângulo equilátero onde os lados são usados como eixos correspondendo aos três constituintes (água, óleo e tensoativo). Cada vértice corresponde a 100% do componente indicado. Podem ser utilizados outros componentes como co-tensoativos e/ou fármacos, principalmente quando se trata de aplicações farmacêuticas. Neste caso, quando quatro ou mais componentes são utilizados, cada vértice do diagrama pode ser representado por misturas binárias como tensoativo/co-tensoativo, água/fármaco ou óleo/fármaco. No interior do diagrama podem-se limitar as regiões em que ocorrem os diferentes sistemas possibilitando a visualização da quantidade relativa dos constituintes (LAWRENCE e REES, 2000).

1.5.6. Caracterização físico-química das formulações

Após o desenvolvimento das formulações, quando várias etapas foram concluídas como: cálculos adequados para obtenção do EHL exigido pela formulação, determinação das proporções que devem ser utilizadas entre os tensoativos e entre o conjunto de tensoativos em relação com a fase oleosa e aquosa, observação do aspecto visual, incorporação do fármaco e determinação da via de administração, as formulações necessitam ser caracterizadas físico-quimicamente com o objetivo de verificar se estas correspondem às expectativas para posteriormente serem testadas *in vitro* e *in vivo*.

1.5.6.1. Raio hidrodinâmico das gotículas

O raio hidrodinâmico das gotículas é de extrema importância, pois além de definir o tipo de formulação, por exemplo, uma emulsão tem o raio em torno de 1000 nm, enquanto microemulsões e nanoemulsões apresentam uma média de 100 nm e 200 nm respectivamente. O valor do raio pode ajudar a definir a melhor via para administração da formulação.

A técnica de “light scattering” fornece informações sobre o movimento translacional das gotículas além de fornecer o raio hidrodinâmico através de relações empíricas adequadas. A determinação do raio é fundamentada no movimento browniano das gotículas onde o coeficiente de difusão destas gotículas no meio é o principal parâmetro para esta determinação (FORMARIZ *et al.*, 2005; ABOOFAZELLI *et al.*, 2000).

1.5.6.2. Reologia

A reologia é o estudo do fluxo e deformação dos materiais quando submetidos a uma tensão (WOOD, 1986). A tensão de cisalhamento e a taxa de cisalhamento são correlacionadas em gráficos gerando as curvas de fluxo, que demonstram o comportamento de fluxo de um líquido. As curvas de fluxo são representadas por duas curvas: ascendente e descendente. A curva ascendente indica o aumento da taxa de cisalhamento e o comportamento de fluxo e a curva descendente indica a redução gradual desta taxa (SCHRAMM, 2006).

O comportamento de fluxo pode ser classificado em newtoniano ou não-newtoniano. Os não-newtonianos podem ser: pseudoplástico, plástico e dilatante. O fluxo classificado como newtoniano é aquele em que a curva de fluxo gera uma reta que passa pela origem, onde todos os pares de valores de taxa e tensão de cisalhamento, pertencentes a esta reta são constantes. Isto significa que a viscosidade não é afetada por mudanças na taxa de cisalhamento, portanto a viscosidade desse tipo de fluxo é constante. Os outros tipos de fluxo que não seguem esse comportamento de fluxo ideal são chamados de não-newtonianos (SCHRAMM, 2006).

O fluxo pseudoplástico ocorre em materiais que sofrem diminuição na viscosidade quando a taxa de cisalhamento passa de níveis baixos para níveis mais altos. O aumento da taxa de cisalhamento orienta partículas rígidas na direção do fluxo gerando *shear thinning*, isto é, afinamento por cisalhamento. O fluxo plástico apresenta a mesma descrição dos pseudoplásticos, porém com limite de escoamento. Somente quando as forças externas são fortes o suficiente para superar as forças de reticulação (tensão de cisalhamento) a estrutura entra em colapso. Nesta curva de fluxo a ordenada é interceptada no ponto crítico (yield

point) e não na origem. O fluxo dilatante ocorre em materiais que quando submetidos ao aumento da taxa de cisalhamento sofrem aumento da viscosidade (SCHRAMM, 2006).

A Tixotropia ocorre sempre que um líquido apresenta capacidade de ter uma estrutura reversível quando mantida em repouso por um longo período de tempo, isto é, a mudança de gel para sol e sol para gel tem que ser reprodutível por diversas vezes. A reconstrução deste sistema pode ser tempo independente quando ao plotarmos uma curva de fluxo para um líquido não-newtoniano sem limite de escoamento, em função da taxa de cisalhamento crescente (curva superior), observa-se a curva inferior com taxa decrescente sobrepor à curva superior. Ou a reconstrução pode ser tempo dependente quando a curva superior não está mais sobreposta à inferior. Neste caso existe uma área de histerese entre as duas curvas, a qual define a magnitude da tixotropia. Esta área indica a energia necessária para quebrar a estrutura tixotrópica. Líquidos tixotrópicos giram no sentido horário da curva: a curva inferior de volta está abaixo da curva superior (SCHRAMM, 2006).

A Reopexia ocorre quando determinado líquido sofre aumento da viscosidade durante o cisalhamento. Quando deixados em repouso, eles recuperam sua forma original, ou seja, de baixo nível de viscosidade. Na curva de fluxo de um sistema com reopexia a curva inferior de volta está acima da curva superior, líquidos reopéticos giram no sentido anti-horário da curva. A reopeticidade e a tixotropia são propriedades de fluxo opostas (SCHRAMM, 2006).

1.5.6.3. Espalhamento de Raios-X a baixo ângulo (SAXS)

Modificações na composição dos sistemas podem resultar em mudanças estruturais nas formulações. As MEs são sistemas menos ordenados com baixa viscosidade, enquanto que sistemas mais ordenados, como fase lamelar, hexagonal e cúbica apresentam propriedades elásticas de sólidos. A mobilidade das moléculas é maior em líquidos do que em

sólidos, e as modificações estruturais podem alterar o perfil de liberação de fármacos (PESTANA 2009, FORMARIZ *et al.*, 2007).

A mistura de óleo, água e tensoativo é capaz de formar uma grande variedade de estruturas, incluindo as estruturas não cristalinas, como microemulsões e emulsões e estruturas cristalinas, como fases lamelares, cúbicas e hexagonais (HYDE, 2001; KREILGAARD, 2002). A técnica de espalhamento de raios X a baixo ângulo (SAXS) tem sido utilizada para a obtenção de informações sobre a estrutura tridimensional de sistemas. As medidas de SAXS associadas à microscopia de luz polarizada permitem estudar as fases formadas resultantes das diferentes proporções de tensoativo e fase oleosa.

Ao irradiar uma amostra bifásica numa placa relativamente fina, com um feixe de luz monocromático (luz visível, raios X, nêutrons, elétrons), observa-se o espalhamento da radiação na vizinhança angular próxima a do feixe transmitido. O espalhamento de raios X deve-se às heterogeneidades na densidade eletrônica das estruturas do sistema. Considerando uma partícula de tamanho e forma qualquer, a intensidade espalhada $I(q)$ é proporcional ao fator de forma $P(q)$ desta partícula, em que q é o vetor de espalhamento (GLATTER, 1982).

Num sistema diluído, em que as partículas são isoladas uma das outras e não interagem entre si, a intensidade espalhada é descrita unicamente pelo fator de forma $P(q)$ (GUINIER, 1964). Nos sistemas formados pela associação de água, óleo, estabilizados com quantidades de tensoativos abaixo da concentração micelar crítica (CMC) requerida, a intensidade obtida pelo SAXS pode ser similar à observada em partículas diluídas ou monodispersas. A intensidade resultante é a soma das contribuições de cada partícula, de modo que, para n partículas distribuídas ao acaso têm-se:

$$I(q) \propto \sum_n P_n(q)$$

Equação 3

Em um sistema concentrado, as partículas espalhadoras são numerosas e interagem entre si, e o espalhamento medido refletirá sua geometria e arranjo. Em sistemas cuja concentração de tensoativos é superior à CMC, as interações entre as moléculas de tensoativos começam a ocorrer em diferentes graus de organização. O padrão de espalhamento poderá então ser similar ao observado em partículas dispersas numa matriz homogênea (GLATTER, 1982). Para N partículas idênticas, distribuídas ao acaso, a intensidade espalhada é descrita pela Equação 4, em que $S(q)$ é o fator de estrutura do conjunto:

$$I(q) = N \cdot P(q) \cdot S(q) \quad \text{Equação 4}$$

Entretanto $S(q)$ pode assumir formas muito variadas, de acordo com o arranjo das entidades espalhadoras, e será difícil separar as contribuições de $P(q)$ e $S(q)$. Ainda, pode-se deduzir uma distância média d , entre duas gotículas ou planos vizinhos, a partir do valor da posição do vetor de espalhamento quando a intensidade é máxima ($q_{\text{máx}}$), empregando a relação:

$$d = 2\pi / q_{\text{máx}} \quad \text{Equação 5}$$

Em sistemas do tipo micelas e MEs, as curvas de SAXS apresentam uma banda ou pico amplo, associado com a baixa correlação espacial 3D (BEAUCAGE *et al.*, 1995). Já sistemas cristalinos com orientação aleatória também podem agregar formando domínios exibindo estruturas uni, bi e tridimensionais. A intensidade $I(q)$ produzida exibe forma máxima (bandas ou picos de Bragg) para valores específicos do vetor de espalhamento q . Se

a curva de espalhamento contiver vários picos, suas posições no eixo q revelam o tipo de estrutura cristalina, e permite calcular parâmetros estruturais (BEAUCAGE *et al.*, 1995).

A estrutura hexagonal, lamelar e cúbica de cristais líquidos liotrópicos pode ser verificada de acordo com a posição dos picos de difração no eixo do vetor de espalhamento q . Para estruturas lamelares, a posição relativa dos picos (em relação ao primeiro pico mais intenso) geralmente obedece à relação $1 \div 2 \div 3 \dots$, enquanto que, para estruturas hexagonais a relação esperada é $1 \div 3 \div 2 \div 7 \dots$ (HOLMQVIST *et al.*, 1997).

O parâmetro espacial d da Equação 5 para estruturas lamelares mede a distância entre duas lamelas adjacentes, e para estruturas hexagonais mede a distância entre o centro de dois cilindros (Figura 6).

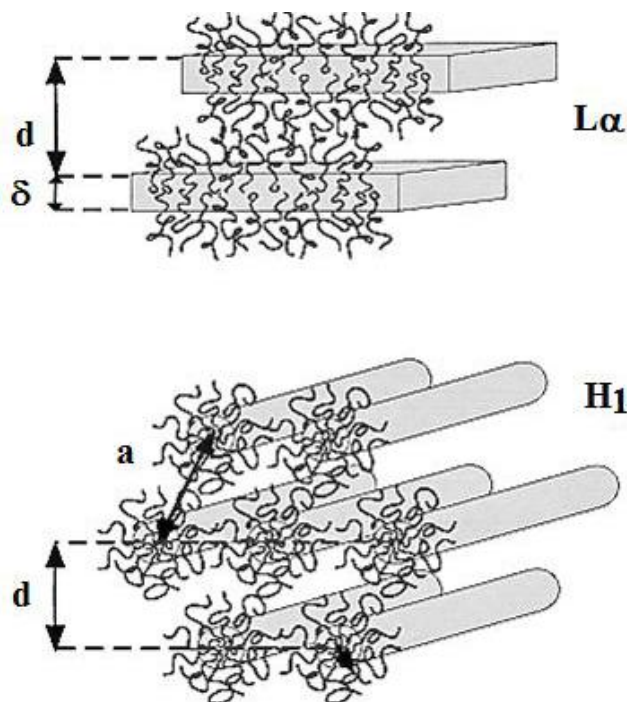


Figura 6. Representação esquemática da auto-organização de tensoativo em estruturas lamelares e hexagonais (HOLMQVIST *et al.*, 1997).

A utilização da técnica de espalhamento de raios X a baixo ângulo (SAXS) na caracterização de sistemas é explicada pela possibilidade de se determinar o tamanho médio e a distância entre os objetos espalhadores, como gotículas, micelas ou estruturas cristalinas. Além disso, essa técnica permite avaliar a estrutura de objetos espalhadores mesmo que eles não estejam organizados de forma ordenada (CARVALHO, 2009).

1.5.6.4. Microscopia de luz polarizada

A microscopia de luz polarizada permite classificar um sistema quanto à isotropia óptica. Sob um plano de luz polarizada a amostra pode ser anisotrópica se for capaz de desviar o plano de luz incidente como ocorre em mesofases lamelares ou hexagonais. A fase lamelar pode ser caracterizada pela visualização de “cruzes de malta” e a fase hexagonal pode ser visualizada pela presença de estrias. ME e mesofases cúbicas são estruturas isotrópicas e, portanto, não desviam a luz, sendo visualizadas como campo escuro (NORLING *et al.*, 1992; BRINON *et al.*, 1999; HYDE, 2001).

1.5.6.5. Difração de raios-X

Os raios-x são radiações eletromagnéticas que podem ser polarizadas, difratadas ou refletidas. A difração de raios-x é fundamentada na condição de interferência construtiva estabelecida pela lei de Bragg. A condição para interferência construtiva da radiação X refletida pelos planos cristalinos de um cristal é dada pela relação (MARADUDIN & MILLS, 1975):

$$2d \operatorname{sen}\theta = n\lambda,$$

sendo: d = distância interplanar, θ = ângulo de difração, n = número de ondas e λ = comprimento de onda de radiação incidente. Esta relação estabelece que para um determinado comprimento de onda, o raio refletido emergirá apenas nos ângulos para os quais a relação acima é satisfeita. Cada pico de difração é produzido por um conjunto de planos. Conjuntos semelhantes estão dispostos no cristal de acordo com sua simetria, assim o arranjo dos pontos reflete a simetria do cristal permitindo a identificação do composto cristalino.

1.5.6.6. Potencial Zeta

O potencial zeta demonstra o potencial elétrico de superfície das gotículas ou partículas. Através de técnicas de eletroforese pode-se verificar este potencial, que é influenciado pelas mudanças na interface com o meio dispersante devido a grupos funcionais da superfície das gotículas ou espécies iônicas do meio dispersante. Diversos componentes são capazes de alterar o potencial zeta de uma formulação, por exemplo: lecitinas e PLA (ácido poli-lático) fornecem um potencial negativo à interface, enquanto poloxamers reduzem esse potencial negativo. Sabe-se que um alto potencial zeta (em módulo) garante boa estabilidade físico-química da dispersão coloidal (SCHAFFAZICK *et al.*, 2003). Alguns estudos já usufruíam do potencial zeta para alcançarem seus objetivos, CALVO *et al.*, 1997 utilizaram quitosana para garantir um potencial zeta positivo, com a intenção de aumentar a interação entre nanoemulsões e nanocápsulas e a membrana biológica fosfolipídica.

O estudo de sistemas nanocarreadores para o MJ é de extrema importância, tendo em vista a insolubilidade do MJ em água e o promissor sucesso das micro e nanoemulsões ao carrear fármacos lipofílicos possibilitando assim a administração intravenosa destas formulações. Além disso, este estudo também visualiza melhorar a relação risco efeito terapêutico através do aumento da eficiência terapêutica e diminuição dos efeitos colaterais. Estas formulações devem ser caracterizadas físico-quimicamente, testadas quanto à liberação do MJ *in vitro* e avaliadas *in vivo* com o modelo de tumor ascítico de Ehrlich.

2. OBJETIVOS

O presente trabalho tem como objetivo geral:

- Desenvolver sistemas nanoestruturados para veiculação do MJ, possíveis de serem administrados por via intravenosa e que resultem em melhoria da atividade terapêutica.

Além disso, tem como objetivos específicos:

- Preparar sistemas micro e nanoemulsionados, por meio da associação de sais de ácidos graxos (SAG), glicerol (G) e fosfatidilcolina de soja (FS) como tensoativo, óleo de soja como fase oleosa e água ultra pura como fase aquosa, teoricamente capaz de servir como sistema carreador, para que possam originar alternativas com importantes vantagens terapêuticas.
- Avaliar o MJ como fase oleosa.
- Caracterizar físico-quimicamente os sistemas selecionados.
- Avaliar a liberação *in vitro* do MJ a partir sistemas selecionados.
- Avaliar a atividade antitumoral em camundongos do MJ e do MJ-ME “*in vivo*” utilizando tumor ascítico de Ehrlich.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Materiais

3.1.2. Matérias-Primas, Reagentes e Solventes

- Ácido clorídrico, Synth, Brasil;
- Álcool etílico comercial;
- Água ultra pura;
- Cloridrato de doxorrubicina;
- Clorofórmio, Merck®, Darmstadt, Alemanha;
- Fosfatidilcolina de soja (Epikuron ® 200), Lucas Mayer, Alemanha;
- Glicerol, Nutricell®, Brasil;
- Hidróxido de Sódio, PA-ACS, Grupo Química, Brasil;
- Laurilsulfato de sódio;
- Membrana de acetato de celulose 0,45µm - Sigma;
- Metanol, J. T. Baker;
- Metildiidrojasmonato, Aldrich-Sigma;
- Solução fisiológica estéril de NaCl 0,9%;
- Sais de ácidos graxos extraídos do óleo de coco;
- Tween 20.

3.1.3. Equipamentos e materiais

- Agitador magnético, P-Selecta, Multimatic-9S;

- Analisador de imagem, Leica DMR-Qwin;
- Analisador de partículas por Espalhamento de luz e Potencial zeta – Malvern Nano modelo ZS, He-Ne laser 633nm, Max 5mW; no Centro de Pesquisa em Permeação cutânea, Faculdade de Ciências Farmacêuticas – USP – Ribeirão Preto;
- Autoclave vertical, Phoenix;
- Balança não analítica (Boeco).
- Câmara de Neubauer, Optick Labor;
- Centrífuga SORVALL, modelo TC;
- Cromatógrafo Shimadzu GC 2010 com detector FID acoplado ao software GC Solution.
- Cubetas de quartzo para espectrofotometria capacidade 5mL, caminho óptico de 1cm - Spectrocell;
- Difratômetro de raio-X modelo Rigaku –2000 com radiação de cobre, monocromatizada por cristal grafite, instalado no Depto de Físico-Química, Instituto de Química – UNESP-Araraquara;
- Estufa de secagem e esterilização, Fanem, modelo 315 SE;
- Evaporador rotatório, Marconi, modelo MA 120;
- Fluxo Laminar Veco, Classe IIB;
- Homogeneizador de tubos, modelo AP22, Phoenix;
- Incubadora Forma®;
- Liofilizador;
- Microscópio com captura de imagem, Nikon Eclipse E200;
- Microscópio de Luz Polarizada, Jenamed 2, Carl Zeiss – Jena;
- Monocromador do tipo Si (111), com comprimento de onda do feixe de raio-X de 1,608Å;
- Paquímetro digital Mitutoyo Digimatic Caliper;
- Peagômetro, Quimis®, modelo Q-400 M2;

- Permeador Microtte Plus Hanson;
- Pipetador automático Gilson capacidade 10, 100 e 1000 μ L;
- Placas de 96 compartimentos, Nunc®;
- Refratômetro de Abbe, Atago;
- Reômetro, Carri Med, modelo CSL100 (TA Instruments);
- Sistema de purificação de água MILLIPORE, Milli-Q Plus;
- Sonicador, Sonicator® Ultrasonic Liquid Processor, Heat System, modelo XL 2020;
- Ultra-som, Branson, modelo 1210;

3.2. Métodos

3.2.1. Obtenção dos sais de ácidos graxos do óleo de coco

Para obtenção dos sais de ácidos graxos foi realizada uma reação de saponificação. Os sais foram extraídos do óleo de coco, cujo índice de saponificação varia de 248-265. Foi adicionada ao óleo de coco quantidade suficiente de solução de hidróxido de sódio. Como resultado da reação de saponificação obteve-se glicerol e os sais de ácido graxo. Esta mistura foi triturada quando tornou-se sólida, e acetona foi adicionada para realização da filtração com o objetivo de retirar as impurezas resultantes desta reação. Após essa filtração, o produto secou em estufa de ar circulante e foi pulverizado com gral e pistilo.

3.2.2. Preparação dos sistemas estabilizados por sais de ácidos graxos, glicerol e fosfatidilcolina de soja.

Em frasco transparente com tampa foram transferidas quantidades adequadas de tensoativos: sais de ácidos graxos (SAG), glicerol (G) e fosfatidilcolina de soja (FS) (Epikuron[®] 200), nas seguintes proporções 8:4:1. Para cada proporção de SAG/G/FS foi adicionada fase oleosa (óleo de soja ou MJ) e em seguida foram tituladas com fase aquosa. Essa sequência de adição facilita a homogeneização da mistura, a qual foi sonicada usando Sonicador[®] Ultrasonic Liquid Processor, modelo XL2020TM, com potência de 220 Watts, operando de modo descontínuo, por 20 minutos em ambiente com temperatura controlada a $25 \pm 0,1^{\circ}\text{C}$. Quando fármaco foi adicionado nas formulações, adicionou-se 20% de MJ porque esta proporção de fármaco foi a maior que se conseguiu incorporar de acordo com aspecto visual. A partir desta concentração de MJ as formulações tornavam-se altamente viscosas.

3.2.3. Diagramas de fases

O sistema emulsivo (**T**) foi obtido de misturas de tensoativo/co-tensoativo (SAG/G/FS), contendo proporções de 8:4:1.

Ao sistema emulsivo (**T**), foi adicionada a fase oleosa (**O**), contendo óleo de soja. Para a obtenção dos diagramas de fase foram usadas as relações de **T/O** na faixa de 1:9 até 9:1. À essa mistura semi-sólida contendo SAG, G, FS e óleo de soja foi adicionada fase aquosa (**A**) com uma pipeta automática, sob agitação em vortex alternada com repouso. As transições de mistura semi-sólida para sistema transparente líquido, sistema transparente

viscoso, sistema opaco viscoso ou sistema opaco líquido, foram detectadas visualmente, contra fundo escuro.

Desta maneira, foram desenvolvidos três diagramas de fases distintos. O primeiro foi obtido na ausência de MJ, ou seja, ao sistema emulsivo e fase oleosa (óleo de soja) realizou-se titulação com fase aquosa. O segundo foi desenvolvido na presença de fármaco, isto é, adicionou-se 20% de MJ ao sistema emulsivo e fase oleosa (óleo de soja) em cada faixa (de 9:1 até 1:9) antes de iniciar a titulação com fase aquosa. O terceiro diagrama foi obtido sem o óleo de soja. O fármaco foi utilizado como fase oleosa, obtendo-se assim a mistura MJ e sistema emulsivo na faixa de 9:1 até 1:9 e esta mistura foi titulada com fase aquosa.

3.2.4. Caracterização físico-química das formulações

Raio hidrodinâmico das gotículas por Espalhamento Dinâmico de Luz

O raio hidrodinâmico médio das gotículas da fase interna foi determinado por espalhamento dinâmico de luz. O Analisador de partículas por Espalhamento de luz (Malvern Nano modelo ZS) apresenta um laser de He-Ne de 5mW e comprimento de onda de 633 nm.

Preparou-se 1g de cada formulação e estas foram diluídas em água ultra pura e colocadas na câmara de análise de modo que o feixe de laser atravessasse a dispersão em toda a sua extensão. A luz espalhada é captada por um fotomultiplicador posicionando a um feixe de laser que aumenta o sinal captado e o envia para um sistema correlator no qual os cálculos são processados e enviados ao computador. A temperatura do sistema foi mantida a 25°C. Foram realizadas 10 determinações do diâmetro das gotículas, com duração de 5 minutos cada leitura.

Reologia do Sistema

Foi utilizado o reômetro Carri Méd CSL 100 com geometria cone-placa para avaliar as propriedades reológicas dos sistemas através de ensaios de escoamento.

Para construir o reograma de tensão de cisalhamento (τ) por taxa de cisalhamento ($\dot{\gamma}$), que possibilita o cálculo da viscosidade dinâmica dos materiais, as formulações foram colocadas sobre a placa em quantidade suficiente para preencher o espaço entre o cone e a placa. Estas foram submetidas a sucessivas velocidades de cisalhamento pela ação do movimento de rotação do cone. A vantagem desta geometria é que não ocorre variação na tensão de cisalhamento através da amostra, porque a distância entre o cone e a placa é muito pequena (da ordem de \dezenas ou centenas de microns), fazendo com que a tensão de cisalhamento seja praticamente uniforme por toda a amostra (TOKUMOTO, 1996).

Foi utilizado cone de 4 cm de diâmetro com espaço de 105 μ m entre cone e placa. Foi empregada velocidade de cisalhamento ($\dot{\gamma}$) entre 0 a 300s⁻¹ e cada medida teve duração de 5 minutos. O comportamento reológico dos sistemas foi determinado e demonstrado em gráficos representativos por curvas ascendentes e descendentes. Todas as análises foram realizadas em triplicata a 25°C.

Microscopia de Luz Polarizada

Estruturas anisotrópicas e birrefringentes podem ser analisadas através da microscopia de luz polarizada (MLP). O polarizador acoplado ao condensador do microscópio de luz polarizada orienta as ondas luminosas provenientes da fonte de luz em uma só direção e em um só plano. Uma substância birrefringente provoca alterações na direção da propagação da luz que são captadas pelo analisador, um segundo sistema de polarização, junto à ocular.

Quando o polarizador e analisador estão com eixos em paralelo o máximo de luz é obtido e, ao contrário quando os eixos são perpendiculares a luz extinguida (ABRAMOWITZ *et al.*, 2010).

Uma gota de cada formulação selecionada foi colocada sobre uma lâmina de vidro e cobertas com lamínula e analisadas em microscópio de luz polarizada (Jenamed 2, Carl Zeiss – Jena).

Difração de Raios-X

O grau de cristalinidade ou o estado amorfo das amostras foram analisados através de difratômetro de raios-X modelo Rigaku-2000 com radiação de cobre, monocromatizada por cristal de grafite. A velocidade de varredura usada foi 0,3 segundos a cada $0,02\theta^0$ em um intervalo de 40^0 a 70^0 .

Para esta análise foi preparado 1g de cada formulação e em seguida estas foram submetidas à liofilização antes da análise.

Espalhamento de Raios-X a Baixo Ângulo (SAXS)

A modificação da microestrutura dos sistemas em função da proporção de fase oleosa, de tensoativo e de fármaco foi avaliada através de Espalhamento de raios-X a baixo ângulo (SAXS). Os dados foram coletados na estação de medidas D11-A SAS do Laboratório Nacional de Luz Sincrotron (LNLS) em Campinas, equipado com um monocromador do tipo Si (111), com comprimento de onda de $1,608 \text{ \AA}$ além de uma câmara de ionização, um detector vertical e um analisador multicanal para registrar a intensidade do espalhamento. Para esta análise foi preparado 5 g de cada formulação.

O espalhamento existente do sistema isento de amostra foi subtraído da intensidade total de espalhamento. As intensidades de espalhamento das amostras foram medidas em unidades relativas. Para comparação quantitativa, as medidas foram normalizadas nas mesmas condições experimentais.

Não foi possível realizar este estudo para todas as formulações. Estas foram selecionadas devido à alta procura do equipamento.

Potencial Zeta

Potencial Zeta é uma medida de magnitude eletrostática de repulsão ou atração de cargas entre as partículas. Este é um parâmetro fundamental para indicar se a estabilidade da formulação é alta ou baixa. Esta medida fornece detalhes sobre as dispersões, como agregação ou floculação e pode ser aplicada para aumentar a estabilidade de dispersões, emulsões e suspensões.

O equipamento utilizado foi o Malvern Nano modelo ZS. O potencial zeta foi verificado nas formulações através da mobilidade eletroforética das amostras. A medição é baseada no efeito de Doppler, ou seja, alteração da frequência sofrida pela luz dispersa por uma partícula em movimento. A contagem dos fótons permite a elaboração de um espectro de frequência a partir do qual o potencial zeta das partículas pode ser calculado.

Preparou-se 1g de cada formulação e estas foram diluídas em água ultra pura para realizar a análise de 10 determinações de potencial zeta para cada formulação.

3.2.5. Determinação do MJ em formulações por cromatografia gasosa acoplada ao detector por íon de chamas (CG-FID)

Sistema Cromatográfico a Gás acoplado ao FID

Um detector de ionização de chama (FID) consiste em uma chama de hidrogênio (H_2)/ ar e um prato coletor. O efluente passa da coluna do CG através da chama, a qual divide em moléculas orgânicas e produz íons. Os íons são recolhidos em um eletrodo negativo e produzem um sinal elétrico. O FID é extremamente sensível com uma faixa dinâmica grande. Sua única desvantagem é que destrói a amostra. Os detectores por ionização de chama são usados para detectar hidrocarbonetos como o metano (CH_4), etano (C_2H_6), acetileno (C_2H_2), etc. A amostra a ser analisada mistura-se com hidrogênio (H_2), hidrogênio mais hélio (He) ou hidrogênio mais nitrogênio (N_2). Os íons e elétrons formados na chama ficam presos em um eletrodo permitindo que uma corrente flua no circuito externo. A corrente é proporcional aos íons formados, o que depende da concentração de hidrocarbonetos nos gases e é detectada por um eletrômetro e mostrado na saída análoga (LINDE, 2013).

O MJ foi quantificado nas formulações por cromatografia gasosa acoplada ao detector por íon de chamas (GC-FID)[®] e os dados instrumentais deste sistema foram: temperatura do injetor (PTV) 300° C, injeção no modo split (1:20), coluna REDTEK RTX-1 de 30m x 0,32mm e 3µm de filme. A fase móvel foi constituída de gás Hélio com vazão de 0,88 mL/min. Rampa de temperatura: 100° C durante 2 minutos, 2°C/min até 180° e 5° C/min até 250°. O equipamento utilizado foi Shimadzu GC 2010 com detector FID acoplado ao software GC Solution.

Curva analítica do MJ

A curva analítica foi obtida em intervalo de concentração de 60 a 2000 ppm de MJ utilizando metanol como solvente. As determinações foram feitas em triplicata. Foi construída uma curva analítica de MJ *versus* área do pico com o objetivo de determinar a concentração do fármaco liberado no meio receptor durante o ensaio de dissolução.

3.2.6. Ensaio de liberação *in vitro*

O Ensaio de liberação *in vitro* foi realizado no equipamento de permeação Microette Plus Hanson. O meio receptor foi determinado após avaliação da solubilidade do fármaco na solução receptora, garantindo a condição sink na fase receptora. A condição sink é garantida quando a concentração do fármaco no meio for 10 vezes menor do que a concentração de saturação, permitindo assim a difusão do fármaco sob um gradiente de concentração (GENNARO, 2000). Foi utilizado o tampão Tris-HCl 0,01M pH 7,2 contendo 0,15% de laurilsulfato de sódio. A liberação do fármaco foi avaliada utilizando-se membrana sintética de acetato de celulose 0,45 μm . As formulações foram colocadas até completar o anel dosador do equipamento (aproximadamente 50 mg de MJ e área de exposição de 1,77 cm^2). Os experimentos foram conduzidos a 37,5°C e a solução receptora constantemente agitada a 300 rpm, por meio de um agitador magnético. Alíquotas de 2 mL foram coletadas nos tempos de 2, 4, 6, 8, 10 e 12 horas, filtradas em membrana 0,45 μm e injetadas em CG para quantificação. Um volume de 0,8 mL foi desprezado antes do início de cada coleta. As alíquotas da coleta e volume desprezados foram repostos automaticamente e utilizadas nos cálculos da quantidade real permeada. Os resultados foram colocados em gráficos para a definição do modelo de cinética adequado para cada formulação.

Foi utilizada como controle, uma solução micelar de MJ composta por tampão Tris-HCl, 20% de MJ e 0,15% de laurilsulfato de sódio. Este tensoativo foi utilizado com a finalidade de solubilizar o MJ.

A Equação 6, demonstrada abaixo, foi utilizada para calcular a quantidade real de MJ liberada/permeada (Q real) em um tempo determinado:

$$Q_{\text{real}, t} = C_t \cdot V_r + \sum V_c \cdot C_c$$

Equação 6

onde:

$Q_{\text{real}, t}$ = quantidade real permeada referente ao tempo t ;

C_t = concentração obtida referente ao tempo t ;

V_r = volume da solução receptora (7 mL);

C_c = concentração da amostragem anterior;

V_c = volume amostrado (coletado + limpeza).

Foi realizada análise estatística (ANOVA) entre os perfis de liberação do controle e das formulações. Além disso, foi aplicado modelo matemático a partir dos gráficos de liberação para observar a cinética de liberação a partir de cada formulação.

3.2.7. Atividade Antineoplásica em Tumor Ascítico de Ehrlich (TAE)

O Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Farmacêuticas - UNESP, Araraquara, considerou o protocolo para uso de animais neste projeto, estruturado dentro dos princípios éticos na experimentação animal do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal - CONCEA e de acordo com a Lei nº 11.977, de 25 de Agosto de

2005 que institui o Código de Proteção aos Animais do Estado de São Paulo, manifestando-se FAVORÁVEL à sua execução, de acordo com Protocolo CEUA/FCF/CAr nº 22/2012.

Inoculação das Células Tumorais e Protocolo Terapêutico

Foram utilizados camundongos da linhagem *Balb/c* fêmeas (18-25g). Os animais foram aclimatados às condições do laboratório pelo período de sete dias, antes de serem submetidos aos procedimentos experimentais.

As células do tumor de Ehrlich foram mantidas in vivo por meio de repiques semanais em camundongos, através da inoculação de 0,5-1 mL de ascite por via intraperitoneal (i.p). Os camundongos, após assepsia local com álcool iodado, foram inoculados subcutaneamente com 0,1 mL da suspensão tumoral ajustada na concentração de 1×10^7 células tumorais/mL em RPMI-1640 para indução do tumor sólido (QUILLES, 2010).

Os tratamentos foram realizados utilizando-se três doses (a cada sete dias) e as substâncias testadas foram ajustadas nas concentrações adequadas (após realização no teste de viabilidade celular) em mg/mL. Os tratamentos foram realizados intraperitonealmente, com auxílio de seringa e agulha. Cada animal foi inoculado, de acordo com as especificações dos grupos de estudo. Cada grupo era composto por 5 animais.

Os animais foram distribuídos nos seguintes grupos:

Grupo I: tratamento realizado com salina 0,9% (veículo) (10 mL/Kg) como controle negativo.

Grupo II: tratamento realizado com doxorrubicina (5 mg/Kg) como controle positivo.

Grupo III: tratamento realizado com microemulsões vazias (10 mL/Kg) como controle negativo do MJ veiculado no sistema.

Grupo IV: tratamento realizado com solução micelar de MJ (5 mg/Kg), preparada com salina,

MJ e 3% de tween 20.

Grupo V: tratamento realizado com MJ incorporado em microemulsão na dose: 2,5 mg/Kg.

Grupo VI: tratamento realizado com MJ incorporado em microemulsão na dose: 5 mg/Kg

Grupo VII: tratamento realizado com MJ incorporado em microemulsão na dose: 10 mg/Kg.

Para a preparação das formulações dos grupos: V, VI e VII foi utilizada a microemulsão G (18% O, 10% T e 72 %A) (Tabela 1) preparada no mesmo da administração. Esta formulação foi escolhida devido aos resultados obtidos na caracterização físico-química, observados adiante.

Remoção dos Tumores

Após 20 dias, os camundongos foram sacrificados e os tumores foram retirados com auxílio de material cirúrgico e medidos em seus diâmetros maior e menor utilizando paquímetro digital Mitutoyo Digimatic Caliper. O tumor também foi pesado com auxílio de uma balança não analítica (Boeco). O volume do tumor foi calculado pela fórmula (ZHOU *et al.*,1998):

$$\text{Volume} = 0,5 \times \text{diâmetro maior} \times (\text{diâmetro menor})^2 \quad \text{Equação 7}$$

A taxa de inibição tumoral foi calculada pela fórmula (SORENSEN *et al.*, 2001):

$$\text{Taxa de inibição (\%)} = (1,0 - \text{volume do tumor do grupo tratado} / \text{volume do tumor do grupo controle}) \times 100\% \quad \text{Equação 8}$$

Análise Histopatológica dos Tecidos Tumorais

Os tumores removidos dos animais de estudos foram fixados em formaldeído, desidratados usando etanol e xileno, embebidos em parafina. Posteriormente foram submetidos a cortes histológicos de 5 µm corados com eosina e hematoxilina em lâminas de vidro. As lâminas foram então analisadas histopatologicamente e fotografadas com auxílio de microscópio com captura de imagem (Nikon Eclipse E200).

Análise da angiogênese pelo Sistema de Gradação para Angiogênese por Microscopia (MAGS)

O sistema de gradação para angiogênese por microscopia (MAGS) foi desenvolvido seguindo a técnica de Brem *et al.* (1972), modificado por Shankar *et al.* (2006). A vasoproliferação (KnN), a hiperplasia de células endoteliais (KeE) e a citologia endotelial (KxX) foram observadas estereometricamente em microscópio óptico em cortes de 5µm do tecido tumoral mamário fixados em formaldeído, desidratados usando etanol e xileno e embebidos em parafina, e posteriormente corados com Hematoxilina e Eosina, utilizando um aumento de 400x. A pontuação foi calculada como:

$$\text{MAGS} = \text{KnN} + \text{KeE} + \text{KxX}$$

Equação 9

Onde as constantes são: Kn = 1, Ke = 3 e Kx = 6.

A vasoproliferação (KnN) possui um valor máximo de 40, com N sendo o número de capilares detectados sob o aumento de 400x em cada campo. A hiperplasia de células endoteliais (KeE) possui valor máximo de 30, sendo E o número de células alinhadas na

seção transversal do capilar, com valor máximo de 10. A citologia endotelial (KxX) possui um valor máximo de 30; X possui um valor entre 0 e 5 indicando a aparência histológica das células endoteliais na zona de hiperplasia, sendo 0 = célula endotelial normal; 1 = célula aumentada, mas com núcleo normal e claro; 2 = célula aumentada, mas com núcleo claro e proeminente; 3 = célula com núcleo grande e hipercromático; 4 = células endoteliais “bizarras”; 5 = células que apresentem figura mitótica. A graduação MAGS calculada por esta fórmula varia entre 0 e 100, em valores arbitrários. Os resultados foram expressos em média \pm desvio-padrão em valores arbitrários, obtidos de 10 campos aleatórios em cada uma das lâminas dos 5 animais de cada grupo de estudo.

Determinação da presença de mitoses

A ocorrência de mitoses foi observada estereometricamente em microscópio óptico em cortes de 5 μ m do tecido tumoral mamário fixados em formaldeído, desidratados usando etanol e xileno e embebidos em parafina, e posteriormente corados com hematoxilina e eosina, utilizando um aumento de 400x. Os resultados foram expressos em média \pm desvio-padrão do número de células em mitose em 5 campos aleatórios de cada lâmina dos 5 animais de cada grupo de estudo.

Análise Estatística

Foi realizada análise estatística (ANOVA) dos resultados obtidos de médias de peso, volume, grau de angiogênese entre todos os tratamentos aplicados nos camundongos.

Considerações Éticas em Relação aos Experimentos com Animais

Os animais utilizados neste estudo eram procedentes do CEMIB (Centro Multidisciplinar para Investigação Biológica), UNICAMP, São Paulo e foram transportados até o biotério experimental do Departamento de Análises Clínicas da FCFAR, que conta com controle adequado de temperatura, umidade, sanitização e iluminação. Durante a permanência no biotério, os animais tiveram acesso livre a alimento (ração padrão) e água potável. Os experimentos foram realizados em laboratório com infra-estrutura adequada e exclusivo para experimentação animal. Ao final dos experimentos, os animais sacrificados foram acondicionados em sacos plásticos apropriados e depositados em freezer específico para aguardar o recolhimento semanal pelo Serviço de Coleta Especial da Prefeitura Municipal de Araraquara, para incineração.

4. RESULTADOS e DISCUSSÃO

4.1. Diagramas de fases pseudoternário para os sistemas estabilizados por SAG/G/FS

Nas Figuras 7, 8 e 9 estão representados os possíveis sistemas obtidos a partir das combinações de óleo de soja (O), sais de ácidos graxos de coco, glicerol, fosfatidilcolina de soja (T) e água (A), na ausência de fármaco, na presença de fármaco e utilizando o fármaco como fase oleosa, respectivamente.

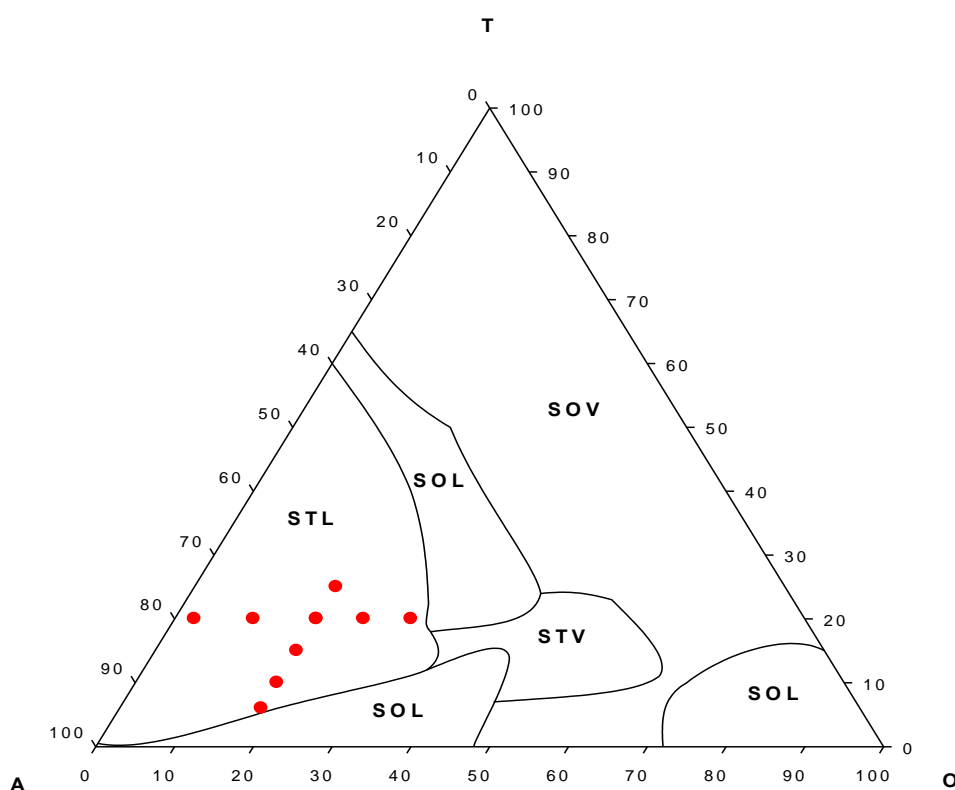


Figura 7. Diagrama de fases pseudoternário de sistemas contendo SAG/G/FS (T), Óleo de soja (O) e Água ultra pura (A). Legenda: Sistema Transparente Líquido (STL), Sistema Transparente Viscoso (STV), Sistema Opaco Líquido (SOL), Sistema Opaco Viscoso (SOV). Pontos em vermelho representam as composições específicas das formulações estudadas na ausência de MJ.

Na ausência de MJ (Fig. 7) foi possível observar a região de sistema transparente líquido formada acima de 40% de fase aquosa, até 30% de fase oleosa e com o máximo de 50% de tensoativo. A região de sistema transparente viscoso encontra-se entre 20 a 50% de fase aquosa, entre 35 a 68% de fase oleosa e de 10 a 25% de tensoativo. Sistema opaco líquido foram observados em três regiões distintas. Inicialmente acima de 45% de fase aquosa, em até 45% de fase oleosa e até 15% de tensoativo. Uma segunda região de sistema opaco líquido situa-se entre 30 e 45% de fase aquosa, com até 40% de fase oleosa e entre 20 e 60% de tensoativo. A terceira região de sistema opaco líquido ocorreu com até 20% de fase aquosa, acima de 70% de fase oleosa com até 15% de tensoativo. Uma grande região de sistema opaco viscoso foi delimitada com até 45% de fase aquosa, até 80% de fase oleosa e entre 5 a 90% de tensoativo.

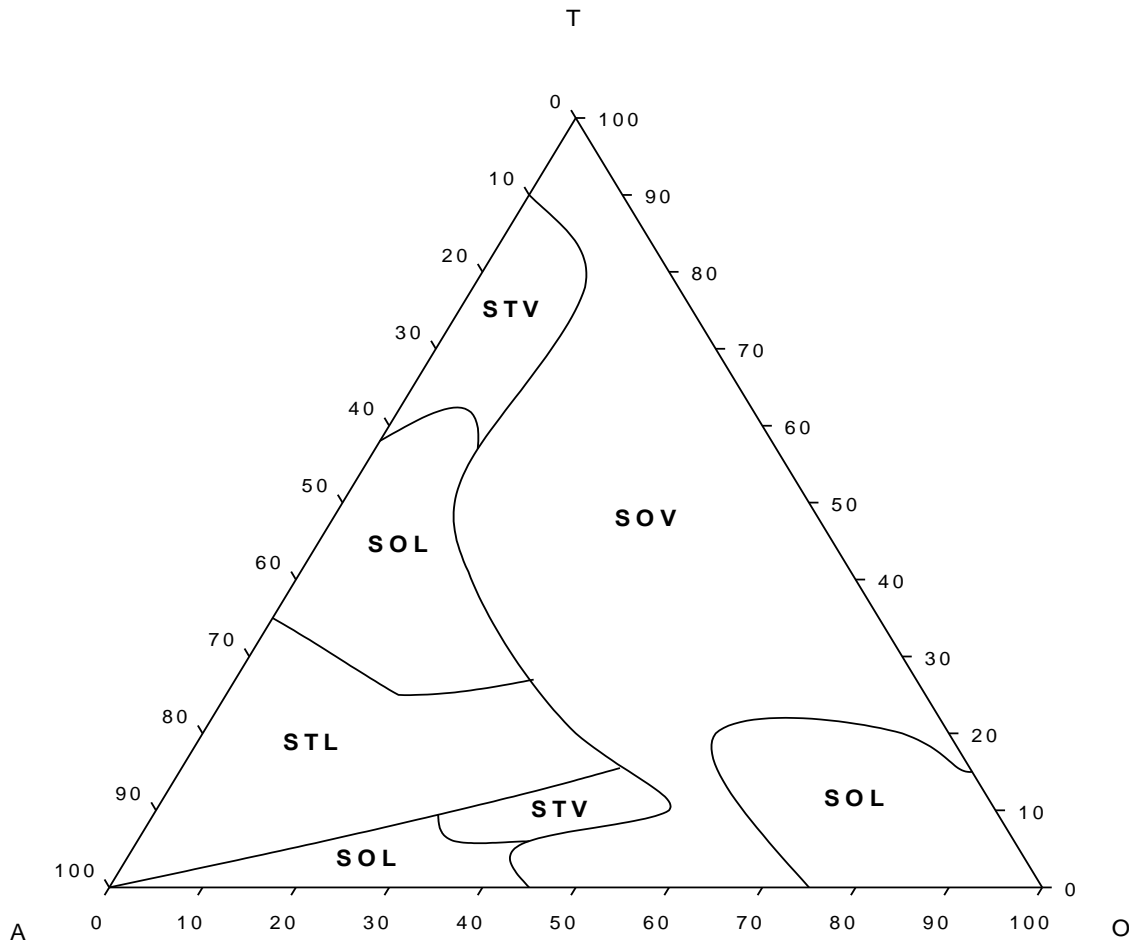


Figura 8: Diagrama de fases pseudoternário de sistemas contendo SAG/G/FS (T), Óleo de soja (O), Água ultra pura (A) e MJ (20%). Legenda: Sistema Transparente Líquido (STL), Sistema Transparente Viscoso (STV), Sistema Opaco Líquido (SOL), Sistema Opaco Viscoso (SOV).

Na Figura 8, está apresentado o diagrama de fases pseudoternário na presença de MJ. Este diagrama assemelha-se ao diagrama de fases na ausência de MJ. Porém algumas diferenças ocorrem como o aumento da região de sistema transparente líquido em relação à porcentagem de fase aquosa e oleosa e diminuição desta região em relação à porcentagem de tensoativo. A região de sistema transparente líquido foi obtida acima de 35% de fase aquosa, com até 50% de fase oleosa e até 35% de tensoativo.

Obtiveram-se duas regiões de sistema transparente viscoso. A primeira região foi semelhante ao diagrama pseudoternário de fases na ausência de MJ, entre 35 a 60% de fase aquosa, de 30 a 57% de fase oleosa e com 8 a 18% de tensoativo. A segunda região de sistema transparente viscoso encontra-se entre 10 a 40% de fase aquosa, até 10% de fase oleosa e entre 60 e 90% de tensoativo. Este diagrama também apresentou três regiões distintas de sistema opaco líquido. A primeira região situa-se de 30 a 65% de fase aquosa, até 30% de fase oleosa e entre 28 e 63% de tensoativo. A segunda região de sistema opaco líquido encontra-se acima de 40% de fase aquosa, até 45% de fase oleosa e até 10% de tensoativo. A terceira região até 25% de fase aquosa, acima de 58% de fase oleosa e com até 22% de tensoativo. A região de sistema opaco viscoso foi ampla, como no diagrama pseudoternário de fases na ausência de MJ, situada com até 40% de fase aquosa, até 80% de fase oleosa e em qualquer proporção de tensoativo.

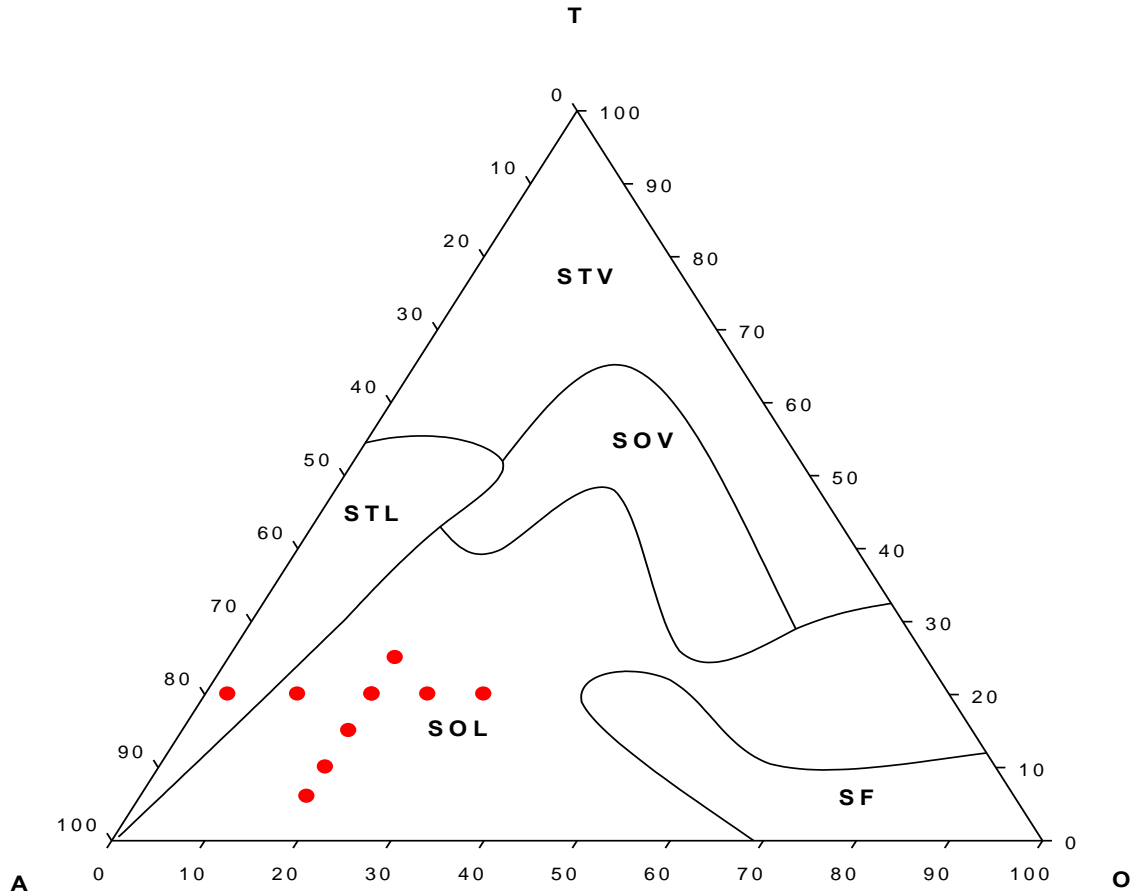


Figura 9: Diagrama de fases pseudoternário de sistemas contendo SAG/G/FS (T), MJ como fase oleosa (O) e Água ultra pura (A). Legenda: Sistema Transparente Líquido (STL), Sistema Transparente Viscoso (STV), Sistema Opaco Líquido (SOL), Sistema Opaco Viscoso (SOV) e Separação de fases (SF). Pontos em vermelho representam as composições específicas das formulações estudadas contendo o MJ como fase oleosa.

Utilizando-se o MJ puro como fase oleosa, as regiões de domínio para a existência dos diferentes sistemas dispersos foram bruscamente modificadas (Fig. 9). A região de sistema transparente líquido ficou restrita: acima de 35% de fase aquosa, com até 12% de MJ e até 55% de tensoativo. Uma região de sistema transparente viscoso foi observada situada em até 42% de fase aquosa, com até 70% de fase oleosa e acima de 30% de tensoativo. Uma região de sistema opaco viscoso esteve localizada de 7 a 42%

de fase aquosa, entre 28 a 68% de tensoativo e entre 15 a 60% de MJ. Uma grande região de sistema opaco líquido foi delimitada em toda extensão de fase aquosa, até 90% de fase oleosa e até 50% de tensoativo. Uma região de separação de fases foi identificada na região de grande predominância de MJ, baixa proporção de fase aquosa e baixa proporção de tensoativo.

A análise destes dados mostra diferenças notáveis entre a estrutura dos sistemas com a variação da proporção dos componentes com ausência ou presença do fármaco ou pela utilização do MJ como fase oleosa.

Na presença de MJ (Fig. 8) a região de sistema transparente líquido diminuiu com relação à dependência de fase aquosa e de tensoativo, porém aumentou com relação à fase oleosa quando comparado com o diagrama na ausência de fármaco (Fig. 7). Ainda na presença de MJ (Fig. 8) apareceu uma nova região de sistema transparente viscoso.

Quando o MJ foi usado como fase oleosa (Fig. 9), devido as suas características lipofílicas, a região de sistema transparente líquido foi muito reduzida e a região de sistema opaco líquido foi bastante expandida em relação ao diagrama pseudoternário de fases sem fármaco (Fig. 7). Já a região de sistema transparente viscoso mudou totalmente de posição e a região de sistema opaco viscoso foi muito reduzida. Apareceu também uma região de separação de fases.

Nos três diagramas, foi possível observar que em altas porcentagens de fase oleosa o sistema torna-se mais viscoso. Isto ocorre devido à alta lipofilia das fases oleosas, óleo de soja (Fig. 7 e 8) e MJ (Fig. 9).

Foi possível observar, novamente em todos os diagramas pseudoternário de fases, que em altas proporções de tensoativo e baixas proporções de fase oleosa e aquosa os sistemas tornaram-se muito viscosos (transparentes ou viscosos) em relação

ao aspecto visual. Um motivo para esta alta viscosidade seria devido às características lipofílicas da fosfatidilcolina de soja (EHL=4), que apresenta capacidade de gelificar quanto absorve pequenas quantidades de água. Devido a esta alta lipofilicidade da fosfatidilcolina, há necessidade de associá-la a co-tensoativos, que podem ser alcoóis de cadeia curta como o glicerol (EHL=11,2) ou ainda os sais de ácidos graxos que apresentam altos valores de EHL (EHL calculado de aproximadamente 20,4), destes ambos apresentam maior grau de hidrofília o que facilita absorção da fase aquosa.

Após estudo detalhado dos sistemas formados e descritos nos diagramas pseudoternários de fase, foram selecionados pontos nos diagramas com o objetivo de caracterizar as formulações além do aspecto visual (transparência ou opacidade e viscosidade ou fluidez).

4.2. Caracterização físico-química dos sistemas selecionados

Os sistemas selecionados para a sequência do trabalho estão detalhados na Tabela 1, 2 e 3 e alguns deles estão representados como pontos vermelhos na Figura 7 e 9. Estes sistemas foram inicialmente selecionados no diagrama pseudoternário de fases na ausência de MJ (Fig. 7) tendo em vista que os pontos estão contidos na região de sistema transparente líquido, região esta que é de extremo interesse para este trabalho, pois partindo do aspecto visual poderia ser uma região de microemulsão. A partir destas composições foram selecionados os pontos seguintes, de semelhante composição, no diagrama pseudoternário de fases que contém MJ como fase oleosa (Fig. 9), porém a região que compreende estas formulações é a de sistema opaco líquido que devido ao aspecto visual poderia ser uma região de nanoemulsão ou emulsão.

Os pontos da Figura 7 representam as formulações: A, B, C D e E que na ausência do fármaco são aqueles que apresentam proporção de tensoativo constante (20%) variando a proporção de fase oleosa de 2,5 a 30% de óleo de soja. Os pontos: F, G, H e I na ausência do fármaco apresentam proporção de fase oleosa constante (18%) variando a proporção de tensoativo de 6 a 25%. Já os pontos: A, B, C, D e E com MJ e F, G, H e I com MJ apresentam a mesma composição das formulações na ausência de fármacos, porém agora com adição de 20% de MJ em cada formulação (Tabela1).

As formulações: J, K, L, M e N apresentam aproximadamente a mesma composição de fase aquosa, fase oleosa e tensoativo com variação de MJ de 4 a 20% (Tabela 2).

Os pontos da Figura 9 representam as formulações O, P, Q, R e S que apresentam proporção de tensoativo constante (20%) variando-se a proporção de fase oleosa (2,5 a 30%) neste caso, o MJ. Os pontos T, U, V e W apresentam proporção de fase oleosa (MJ) constante (18%) variando a proporção de tensoativo (6 a 25%) (Tabela 3).

Tabela 1. Composição das formulações com variação da proporção de fase oleosa e formulações com variação da proporção de tensoativo na ausência e presença de MJ.

Formulações	Fase oleosa (%)	Tensoativo (%)	O/T	Fase aquosa (%)	MJ (%)
A	2,5	20	0,125	77,5	0
B	10	20	0,5	70	0
C	18	20	0,9	62	0
D	24	20	1,2	56	0
E	30	20	1,5	50	0
F	18	6	3	76	0
G	18	10	1,8	72	0
H	18	15	1,2	67	0
C	18	20	0,9	62	0
I	18	25	0,72	57	0
A MJ	2,5	20	0,125	77,5	20
B MJ	10	20	0,5	70	20
C MJ	18	20	0,9	62	20
D MJ	24	20	1,2	56	20
E MJ	30	20	1,5	50	20
F MJ	18	6	3	76	20
G MJ	18	10	1,8	72	20
H MJ	18	15	1,2	67	20
C MJ	18	20	0,9	62	20
I MJ	18	25	0,72	57	20

Tabela 2. Composição das formulações com proporção de MJ crescente.

Formulações	Fase oleosa (%)	Tensoativo (%)	O/T	Fase aquosa (%)	MJ (%)
J	23	19	1,2	54	4
K	22	18,5	1,18	51,5	8
L	21	17,5	1,2	49,5	12
M	20	17	1,17	47	16
N	19	16	1,18	45	20

Tabela 3. Composição das formulações com MJ como fase oleosa.

Formulações	Fase oleosa MJ (%)	Tensoativo (%)	Fase aquosa (%)
O	2,5	20	77,5
P	10	20	70
Q	18	20	62
R	24	20	56
S	30	20	50
T	18	6	76
U	18	10	72
V	18	15	67
Q	18	20	62
W	18	25	57

Todas as formulações foram selecionadas para a sequência do estudo e caracterizadas físico-quimicamente, com o objetivo de avaliar o efeito da variação da proporção de tensoativo, de fase oleosa e do MJ e ainda como estas variações interferem na organização estrutural dos sistemas.

Determinação do Raio Hidrodinâmico das gotículas por Espalhamento dinâmico de luz

O raio hidrodinâmico das gotículas foi verificado através da técnica de Espalhamento dinâmico de luz (light scattering), também conhecido como espectroscopia de fotocorrelação. Todas as formulações foram diluídas antes da análise, pois quando o sistema é concentrado e/ou polidisperso pode haver interações interpartículas e assim o número de gotículas por unidade de volume pode interferir na difusão levando a erros experimentais no tamanho das gotículas, tendo em vista que o coeficiente de difusão pode diminuir à medida que o raio hidrodinâmico aumenta (LAWRENCE *et al.*, 2000; ABOOFAZELI *et al.*, 2000).

Os valores obtidos do raio hidrodinâmico das gotículas estão na Tabela 4 e 5.

Tabela 4. Raio hidrodinâmico (Raio) das gotículas e índice de polidispersidade (Pld) das formulações com variação de proporção de fase oleosa e variação de proporção de tensoativo na ausência e na presença de MJ.

Formulações	Raio (nm)	Pld	Formulações	Raio (nm)	Pld
A	102,90	0,171	A MJ	588,50	0,250
B	93,71	0,171	B MJ	219,70	0,113
C	87,72	0,176	C MJ	223,30	0,187
D	74,21	0,139	D MJ	205,40	0,215
E	62,43	0,130	E MJ	320,40	0,113
F	185,80	0,290	F MJ	86,42	0,218
G	120,60	0,157	G MJ	72,42	0,344
H	106,00	0,169	H MJ	102,30	0,143
C	87,72	0,176	C MJ	223,30	0,187
I	64,46	0,137	I MJ	375,80	0,224

Tabela 5. Raio hidrodinâmico (Raio) das gotículas e índice de polidispersidade (Pld) das formulações com variação de MJ e das formulações em que MJ foi utilizado como fase oleosa.

Formulações	Raio (nm)	Pld	Formulações	Raio (nm)	Pld
O	229,90	0,226	J	61,33	0,098
P	nd	Nd	K	88,58	0,052
Q	206,30	0,414	L	147,10	0,065
R	340,60	0,347	M	196,10	0,063
S	400,50	0,412	N	285,10	0,168
T	626,20	0,144			
U	1299,00	0,307			
V	nd	Nd			
Q	206,30	0,414			
W	1241,00	0,973			

nd=não detectável

Na Figura 10 estão representados os gráficos que mostram a relação entre o raio hidrodinâmico das gotículas e aumento da proporção de fase oleosa nas formulações na ausência de MJ (Fig.10a), nas formulações contendo MJ (Fig.10b) e mostram a relação do raio hidrodinâmico das gotículas e aumento da proporção de tensoativo nas formulações na ausência de MJ (Fig.10c) e presença de MJ (Fig.10d).

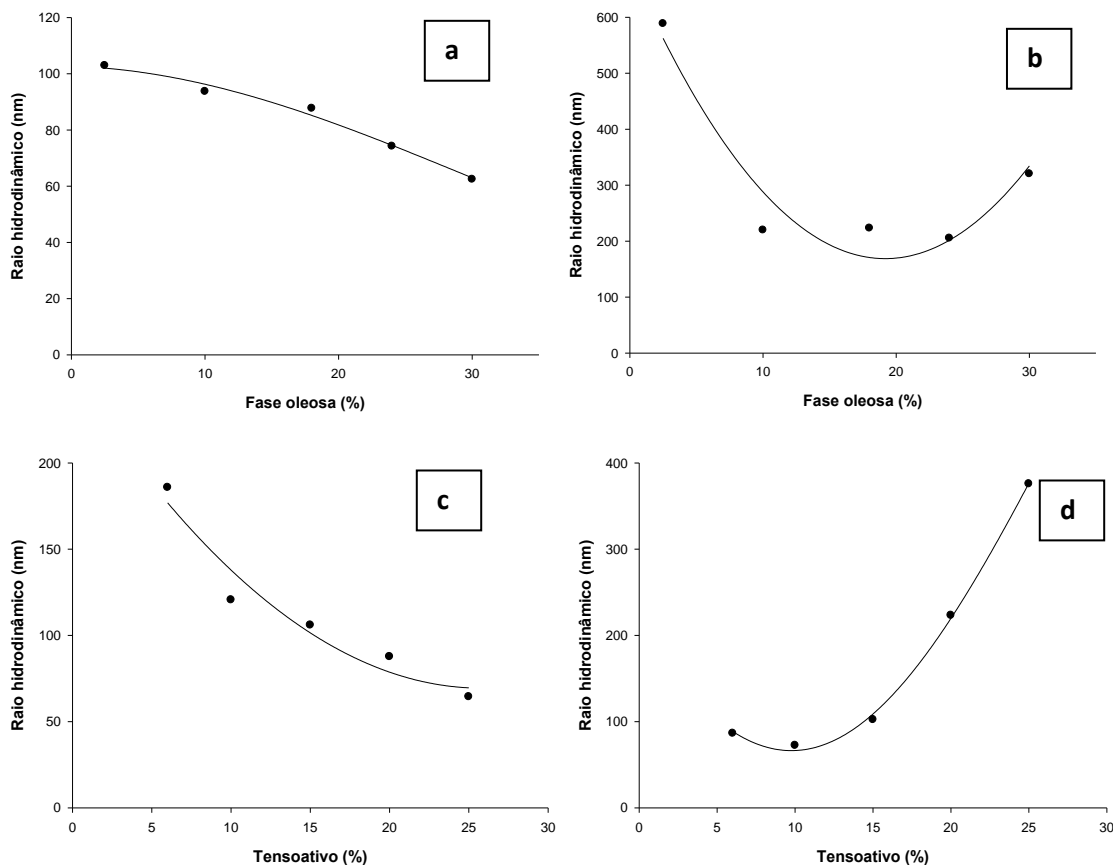


Figura 10. Variação do raio hidrodinâmico das gotículas em função da fase oleosa: a) na ausência de fármaco; b) na presença de fármaco; e em função da proporção de tensoativo: c) na ausência de fármaco e d) na presença de fármaco.

A Figura 10a mostra que à medida que a fase oleosa aumenta nas formulações isentas de MJ o raio hidrodinâmico das gotículas diminui de 102,9 até 62,43 nm e nas formulações contendo MJ (Fig.10b) o raio hidrodinâmico também diminui de 588,5 até 320,4 nm. Porém pode-se notar que a adição do MJ gerou um aumento brusco do raio hidrodinâmico das gotículas, por exemplo, na formulação A isenta de MJ o raio hidrodinâmico foi de 102,9 nm enquanto na formulação A com MJ o raio hidrodinâmico foi de 588,5 nm.

Na Figura 10c pode-se observar que com aumento da proporção de tensoativo das formulações isentas de MJ houve diminuição no raio hidrodinâmico das gotículas de 185,8 para 64,46 nm, o que era esperado já que o tensoativo tem a capacidade de reduzir o raio hidrodinâmico das gotículas. Já na Figura 10d foi possível observar que com adição do MJ inicialmente há uma queda no raio hidrodinâmico de 86,42 para 72,42 em baixas proporções de fase oleosa mas a partir deste ponto o raio hidrodinâmico aumenta até 375,8nm. Isto significa que até a formulação com 10% de tensoativo na presença de MJ o tensoativo age de modo a estabilizar o sistema termodinamicamente, a partir deste ponto as formulações não foram mais estabilizadas pelo tensoativo. Nota-se que a incorporação do fármaco aumentou o raio hidrodinâmico das gotículas nas formulações de maior proporção de tensoativo.

Na Figura 11, estão os gráficos que mostram o que ocorre com o raio hidrodinâmico das gotículas com o aumento da proporção de MJ (Fig.11a); o que ocorre com o raio hidrodinâmico se a fase oleosa é substituída por MJ (Fig.11b) e o que ocorre com aumento da proporção de tensoativo nestas formulações que tem MJ como fase oleosa (Fig.11c).

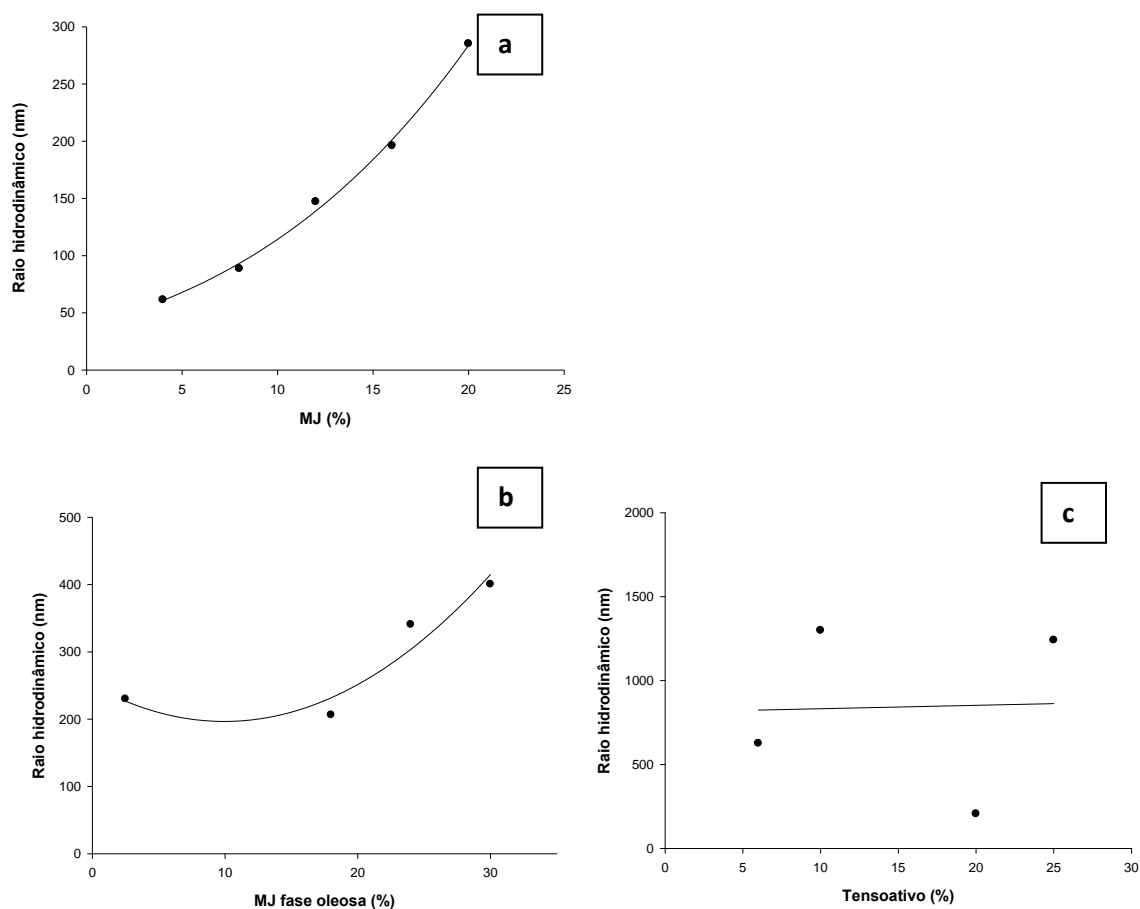


Figura 11. Variação do raio hidrodinâmico das gotículas em função: a) do aumento da proporção de MJ como fármaco; b) do aumento da proporção de MJ como fase oleosa; c) em função do aumento da proporção de tensoativo.

Na Figura 11a, foi possível observar que à medida que aumentou-se a concentração de MJ (4 a 20%) o raio hidrodinâmico das gotículas aumentou 61,33 para 285,10 nm, deixando claro que a incorporação do fármaco aumenta o diâmetro das gotículas da fase oleosa, como demonstrado no diagrama de fases pseudoternário em que a incorporação do fármaco (Fig.8) aumentou as regiões de sistema opaco líquido (gotículas maiores) quando comparado ao diagrama na ausência de fármaco (Fig. 7). Na Figura 11b, quando o óleo de soja é substituído por MJ na fase oleosa, nota-se que com

aumento da proporção de MJ, o raio hidrodinâmico tende a aumentar de 229,9 nm para 400,5 nm. Na Figura 11c observou-se que com o aumento de tensoativo, o raio hidrodinâmico inicialmente aumentou de 626,2 para 1299,0 depois caiu para 206,3 e voltou a subir para 1241,0. Estes resultados mostram que estas formulações já não são micro ou nanoemulsões, já que o diâmetro assemelha-se ao de emulsões, que são instáveis do ponto de vista termodinâmico. E isto pode ser comprovado através do diagrama pseudoternário de fases que contém MJ como fase oleosa (Fig.9) em que esses pontos que apresentaram raios hidrodinâmicos elevados encontram-se na possível região de emulsão.

Através da Tabela 4 pode-se verificar que as formulações na ausência e presença de MJ apresentaram um baixo índice de polidispersidade, variando entre 0,1 e 0,3. Isto significa que estas formulações apresentaram um comportamento unimodal indicando homogeneidade da formulação. A Tabela 5 mostra que o índice de polidispersidade manteve-se bem baixo (0,05 a 0,1) para as formulações onde a proporção de MJ sofreu variação. Já as formulações em que o MJ foi utilizado como fase oleosa, sofreram um aumento do índice de polidispersidade (0,1 a 0,9) indicando um comportamento multimodal à medida que este índice se aproxima de 1.

Análise Reológica

O estudo da reologia é útil para avaliar sistemas microemulsionados, pois o comportamento do fluido está relacionado com o tipo e grau de organização do sistema (FORMARIZ *et al.*, 2005).

O comportamento reológico das formulações selecionadas foi avaliado através do ensaio de escoamento.

A Figura 12a e 12b mostra o perfil reológico das formulações sob influência da fase oleosa na ausência e presença de MJ, respectivamente. A Figura 12c e 12d sob influência da proporção de tensoativo, na ausência e presença de MJ, respectivamente.

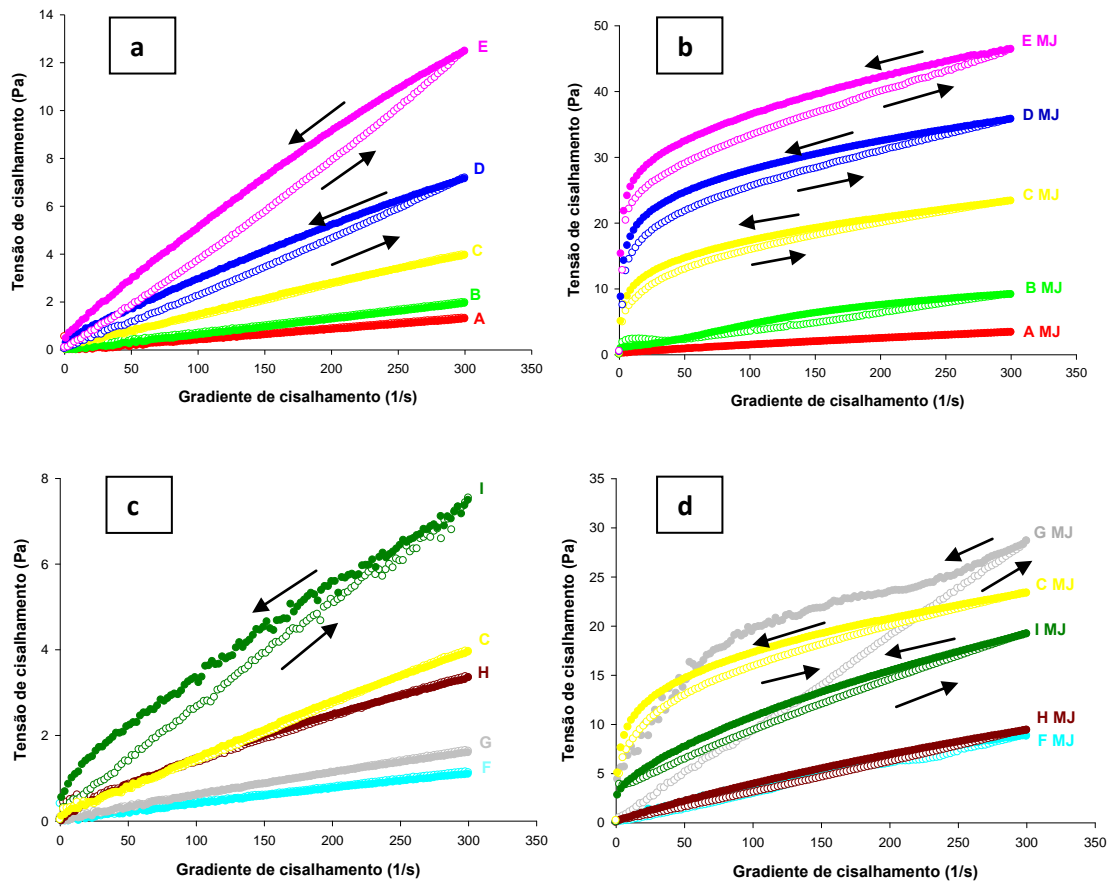


Figura 12. Perfil reológico das formulações em função: a) da proporção de fase oleosa na ausência de MJ e b) presença de MJ; e em função: c) da proporção de tensoativo na ausência e d) presença de MJ. As curvas ascendentes e descendentes estão representadas, respectivamente, por símbolos vazios e cheios.

Na Figura 12a foi possível observar que o comportamento reológico das formulações variou de acordo com o aumento da fase oleosa. A transição do comportamento reológico pode ser confirmada pelo comportamento de fluxo (n) na

Tabela 6. A formulação de menor proporção de fase oleosa na ausência de MJ (2,5%O) apresentou comportamento newtoniano, que pode ser confirmado pela viscosidade constante com modificações na taxa de cisalhamento e índice de comportamento de fluxo muito próximo de 1 (0,99). A formulação com 10% de fase oleosa apresentou comportamento tixotrópico e a formulação com 18% de fase oleosa na ausência de MJ apresentou comportamento pseudoplástico, ou seja, em ambos os casos a viscosidade diminui a medida que a taxa de cisalhamento aumenta e o comportamento de fluxo de ambos é menor que 1. A partir deste ponto, as formulações com 24 e 30% de fase oleosa passaram a apresentar comportamento reopético, representado pelo aumento da viscosidade durante o cisalhamento e laço de histerese ao mesmo tempo, este último representado pela curva de volta estar acima da curva de ida (sentido anti-horário), além de apresentarem índice de comportamento de fluxo maior que 1.

A Figura 12b mostra que o comportamento das formulações é anti-tixotrópico quando 20% de fármaco foi adicionado a cada formulação, com exceção da formulação de menor proporção de fase oleosa (A MJ = 2,5% fase oleosa) que apresentou comportamento pseudoplástico. A formulação de menor proporção de fase oleosa na presença de MJ apresentou perfil de reconstrução tempo independente, ou seja, as curvas ascendentes e descendentes se sobrepõem o que caracteriza o comportamento pseudoplástico, além da diminuição da viscosidade com o aumento da taxa de cisalhamento. À medida que ocorre aumento da fase oleosa na presença de MJ as formulações passaram a apresentar anti-tixotropia, aumentando o laço de histerese à medida que aumentamos a proporção de fase oleosa. A anti-tixotropia foi confirmada com a redução da viscosidade com o aumento da taxa de cisalhamento e pelo fato da curva da volta estar acima da curva da ida. Tanto o comportamento pseudoplástico

como o anti-tixotrópico devem apresentar um índice de comportamento de fluxo menor que 1.

A Figura 12c, demonstra o perfil reológicos das formulações na ausência de MJ à medida que aumenta-se a proporção de tensoativo. A formulação com 6% de tensoativo apresentou tixotropia, embora apresente um laço de histerese bem pequeno, comprovada pela redução da viscosidade com o aumento da taxa de cisalhamento além da curva inferior de volta estar abaixo da curva superior de ida. Com aumento de tensoativo na ausência de MJ as formulações (G, H e C: 10, 15 e 20% tensoativo) apresentaram perfil de reconstrução tempo-independente com comportamento pseudoplástico, representado pela redução de viscosidade com o aumento da taxa de cisalhamento. A Formulação I com 25% de tensoativo apresentou anti-tixotropia, pelo fato de obter redução da viscosidade quando aumentamos a taxa de cisalhamento e a curva de volta estar acima da curva de ida. Todos os índices de comportamento de fluxo destas formulações foram menor que 1 confirmando o comportamento de fluxo descrito.

A Figura 12d mostra que com adição de 20% de MJ e com aumento da proporção de tensoativo, as formulações apresentaram comportamento reopético em baixas proporções de tensoativo (6, 10 e 15 %) e anti-tixotropia com o aumento de tensoativo (20 e 25%). Apesar de todas estas formulações de 6 a 25 % de tensoativos apresentarem curva de volta acima da curva de ida, o comportamento reopético nas mais baixas proporções de tensoativo pode ser confirmado pelo aumento da viscosidade enquanto o anti-tixotrópico é confirmado pela redução da viscosidade à medida que aumentamos a taxa de cisalhamento. Além disto, o índice de comportamento de fluxo de uma curva reopética deve ser maior que 1, enquanto de uma curva anti-tixotrópica deve ser menor que 1.

Na Figura 13 está representado o perfil reológico das formulações com variação da proporção de MJ (Fig.13a), com variação de MJ como fase oleosa (Fig.13b) e com variação de tensoativo (Fig.13c).

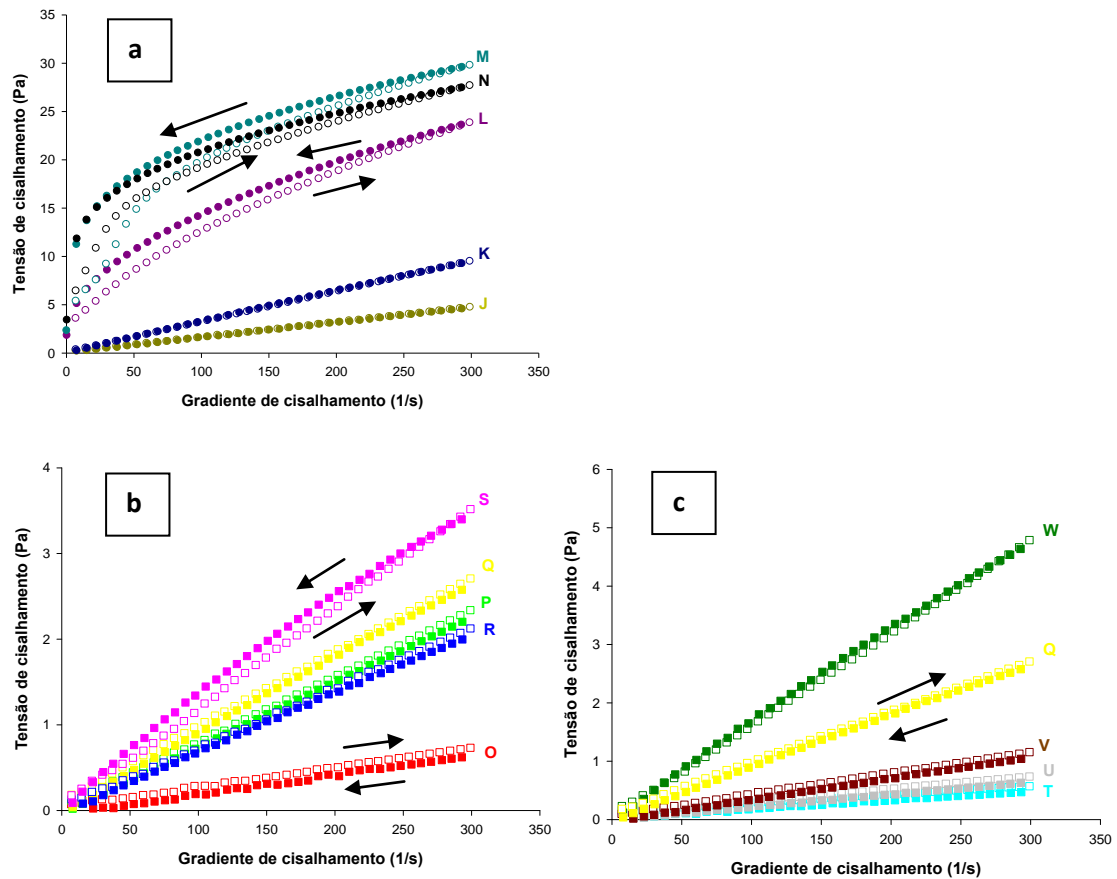


Figura 13. Perfil reológico das formulações em função: a) da proporção de MJ; b) da proporção de MJ como fase oleosa; c) da proporção de tensoativo tendo MJ como fase oleosa. As curvas ascendentes e descendentes estão representadas, respectivamente, por símbolos vazios e cheios.

Na Figura 13a pode-se observar o comportamento reológico das formulações à medida que a proporção de MJ é aumentada nas formulações. Em baixas porcentagens de MJ (4 e 8%) as curvas apresentam perfil de reconstrução tempo independente e

comportamento de um fluxo newtoniano, isto é, viscosidade constante independente da taxa de cisalhamento aplicada e também apresentaram índice de comportamento de fluxo próximo a 1. Com aumento de MJ (12, 16 e 20%) as curvas passam a apresentar anti-tixotropia, devido à redução da viscosidade com o aumento da taxa de cisalhamento e pelo fato de a curva de volta ser acima da curva de ida.

Na Figura 13b, quando óleo de soja foi substituído por MJ, a formulação com 2,5% MJ apresentou tixotropia. À medida que a proporção de MJ como fase oleosa foi aumentada as curvas sofrem transição para um comportamento pseudoplástico. Tanto o comportamento tixotrópico como o pseudoplástico sofrem redução da viscosidade com o aumento da taxa de cisalhamento e ambos apresentam índice de comportamento de fluxo menor que 1, porém o que os diferencia é o fato de o comportamento pseudoplástico ser independente do tempo, enquanto o tixotrópico é dependente do tempo. Apenas a formulação de 30% MJ apresentou anti-tixotropia.

Na Figura 13c, tendo as formulações MJ como fase oleosa constante (18%) foi possível observar o comportamento reológico conforme a proporção de tensoativo foi aumentada. As formulações de 6 até 15% de tensoativo apresentaram tixotropia, isto significa redução da viscosidade com aumento da taxa de cisalhamento e curva de volta abaixo da curva de ida. A formulação com 20% de tensoativo apresentou comportamento pseudoplástico, reconstrução tempo-independente com redução da viscosidade à medida que aumentou-se a taxa de cisalhamento, enquanto a formulação com maior porcentagem de tensoativo (25%) apresentou reconstrução tempo independente com uma curva de fluxo newtoniano e índice de comportamento de fluxo próximo a 1.

Foi utilizado o modelo de lei de potência (SCHRAMM, 2006) para confirmar o índice de comportamento do fluxo e o índice de consistência, que pode ser descrito pela

equação calculada através da inclinação da curva de fluxo. Esta inclinação é determinada por meio de cálculos de regressão usando as equações de Oswald-de-Waele ou Power-Law:

$$\tau = k.(\gamma)^n \quad \text{Equação 10}$$

onde: τ é a taxa de cisalhamento, k é o índice de consistência, γ é a tensão de cisalhamento e n é o índice de comportamento de fluxo. Este modelo retrata o desvio em relação ao comportamento Newtoniano, portanto $n > 1$ representa um fluido dilatante ou reopético, $n < 1$ representa um fluido pseudoplástico, tixotrópico ou anti-tixotrópico e $n = 1$ representa um fluido newtoniano.

Tabela 6. Índice de comportamento de fluxo (n) e índice de consistência (K) para as formulações com variação na proporção de fase oleosa e formulações com variação na proporção de tensoativo, na presença e ausência de MJ.

Formulação	K	n	Formulação	K	n
A	0,004	0,99	A MJ	0,04	0,771
B	0,01	0,92	B MJ	0,10	0,78
C	0,01	0,94	C MJ	3,59	0,32
D	0,01	1,04	D MJ	7,60	0,26
E	0,02	1,09	E MJ	11,53	0,23
F	0,006	0,91	F MJ	0,03	0,97
G	0,009	0,91	G MJ	0,09	1,00
H	0,038	0,78	H MJ	0,02	1,01
C	0,01	0,94	C MJ	3,59	0,32
I	0,039	0,91	I MJ	0,61	0,59

Tabela 7. Índice de comportamento de fluxo (n) e índice de consistência (K) para as formulações com variação na proporção de MJ e formulações com MJ utilizado como fase oleosa.

Formulação	K	n	Formulação	K	n
J	0,017	0,97	T	0,020	0,57
K	0,03	0,99	U	0,012	0,71
L	0,88	0,57	V	0,008	0,85
M	2,64	0,42	Q	0,015	0,89
N	4,01	0,33	W	0,016	0,98
O	0,005	0,86			
P	0,009	0,96			
Q	0,015	0,89			
R	0,008	0,97			
S	0,013	0,98			

As Tabelas 6 e 7 apresentam o índice de comportamento de fluxo e o índice de consistência das formulações estudadas. A partir dos resultados é possível confirmar que as formulações com variação de fase oleosa na ausência de MJ apresentam transição de comportamento newtoniano, tixotrópico, pseudoplástico e reopético, pois o n inicialmente está muito próximo de 1 para a formulação de menor proporção de fase oleosa e a medida que a fase oleosa é aumentada os valores de n são menores de 1 (comportamento tixotrópico e pseudoplástico). Nas maiores proporções de fase oleosa n torna-se maior que 1 confirmando o comportamento reopético. Na presença de MJ e com aumento da proporção de fase oleosa todas as formulações apresentam $n < 1$, confirmando o comportamento inicialmente pseudoplástico e depois anti-tixotrópico a

medida que a proporção de fase oleosa foi aumentando. Na ausência de MJ com aumento da proporção de tensoativo as formulações apresentaram $n < 1$ de acordo com o comportamento tixotrópico, pseudoplástico e anti-tixotrópico, sendo que na presença de MJ o índice de comportamento de fluxo foi maior que 1, em baixas proporções de tensoativo devido ao comportamento reopético destas formulações, tornando-se menor que 1 a medida que a proporção de tensoativo aumentou, devido ao comportamento anti-tixotrópico.

As formulações em que ocorreu variação da proporção de MJ apresentaram transição de comportamento newtoniano (n próximo a 1) em baixas proporções de MJ e comportamento anti-tixotrópico ($n < 1$) em altas proporções de MJ.

Já as formulações onde MJ foi utilizado como fase oleosa a variação de MJ gerou uma transição de comportamento tixotrópico, pseudoplástico e anti-tixotrópico gerando, portanto um índice de comportamento de fluxo sempre menor que 1. Com variação de tensoativo tendo MJ como fase oleosa em baixas proporções de tensoativo o comportamento foi tixotrópico e pseudoplástico ($n < 1$) e passou a ser newtoniano na mais alta proporção de tensoativo (n próximo a 1).

Através dos dados das Tabelas 6 e 7, pode-se observar que o índice de consistência (K) aumenta com o aumento da proporção de fase oleosa. Na ausência de MJ com variação de fase oleosa o índice de consistência varia de 0,004 para 0,02, ou seja, o índice de consistência sofre aumento a medida que se aumenta fase oleosa. Com adição de MJ este índice varia de 0,04 para 11,53, isto significa que além deste índice aumentar com o aumento da fase oleosa ele aumenta mais de 500 vezes com a incorporação do MJ em altas proporções de fase oleosa. Quando ocorre variação apenas do MJ, o índice de consistência aumenta de 0,017 para 4,01 a medida que o MJ utilizado como fármaco é aumentado. Quando o MJ é utilizado como fase oleosa o

índice varia de 0,005 para 0,013 com aumento do MJ. Estes dados mostram que a viscosidade é dependente da fase oleosa (óleo de soja) utilizado no sistema, e neste caso, o MJ por ser um fármaco lipofílico também influenciou muita na viscosidade e consistência das formulações.

Microscopia de Luz Polarizada

Os resultados de microscopia de luz polarizada das formulações na ausência de MJ estão apresentados na Figura 14. Verifica-se que independente da variação de proporção de fase oleosa as formulações apresentaram campo escuro com raras presenças de cruz de malta. As formulações na ausência de MJ com variação da proporção de tensoativo também apresentaram campo escuro com rara presença de cruz de malta. O campo escuro mostra que estas formulações não desviam luz sob plano de luz polarizada indicando isotropia do sistema. A presença de cruz de malta indica fase lamelar, porém devido à raridade das cruzeiras (alguns casos apenas uma cruz por toda lâmina) estas podem ter aparecido devido a algum componente da formulação (por exemplo, o sal de ácido graxo) ou interação entre eles (sais de ácido graxo e óleo de soja).

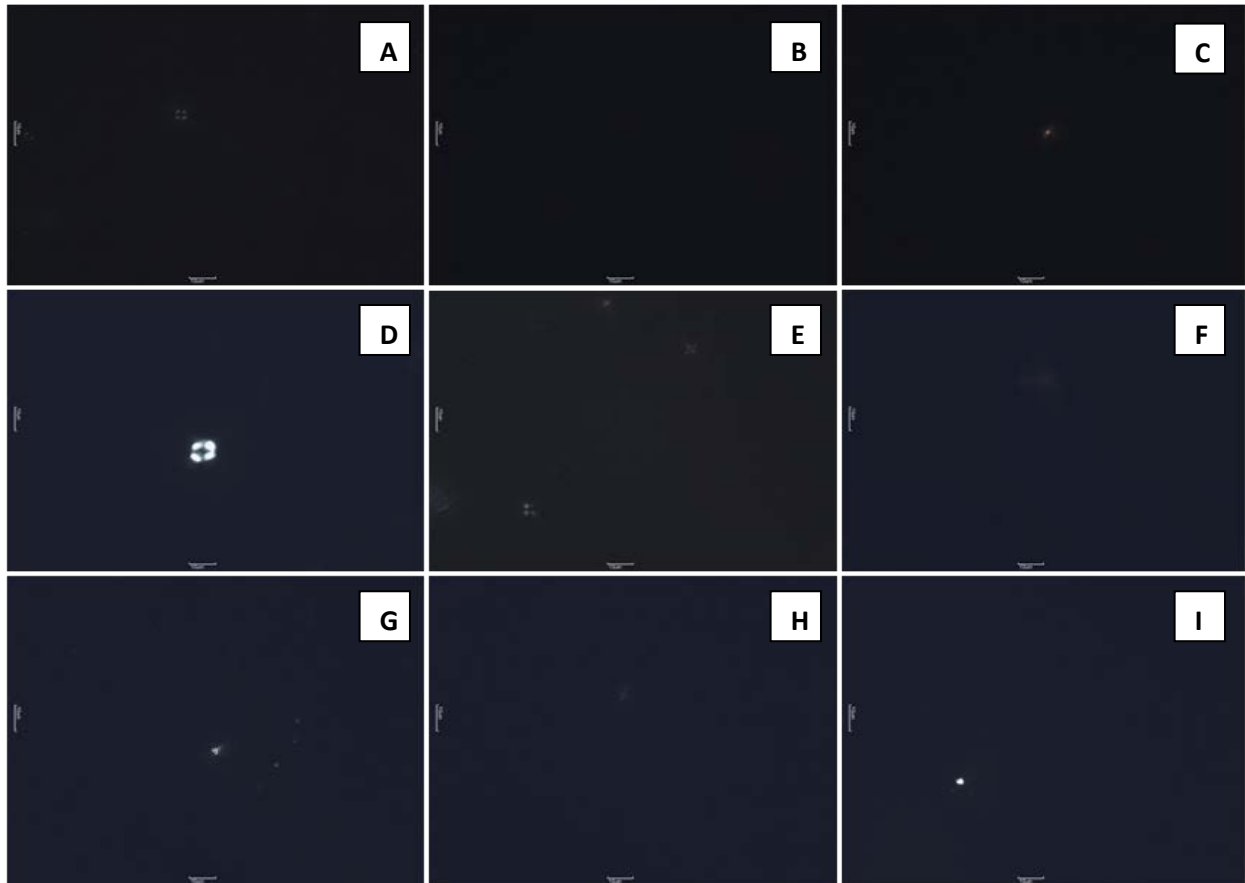


Figura 14. Fotomicrografias das formulações preparadas com proporções crescentes de fase oleosa (A: 2,5%, B: 10%, C: 18%, D: 24% e E: 30%) e tensoativo constante (20%) e com proporções crescentes de tensoativo (F: 6%, G: 10%, H: 15%, C: 20% e I: 25%) e fase oleosa constante (18%) na ausência de MJ.

A Figura 15 mostra as fotomicrografias das formulações na presença de MJ. Em baixas proporções de fase oleosa na presença de MJ as formulações apresentaram campo escuro, indicando isotropia do sistema, mas à medida que aumentou-se a proporção de fase oleosa, as fotomicrografias deixam de apresentar campo escuro. Com a variação da proporção de tensoativo na presença de MJ as formulações de baixa proporção de tensoativo apresentaram campo escuro, tendo rara presença de cruz de malta, indicando isotropia. Já à medida que a proporção de tensoativo foi aumentando, nota-se nas fotomicrografias novamente estas a transição para um campo não escuro.

Essa modificação indica aumento do raio hidrodinâmico das gotículas destas formulações, isto é, transição de microemulsão ou nanoemulsão para emulsão, que pode ser comprovado com a Tabela 4, à medida que aumentou-se a proporção de fase oleosa e tensoativo.

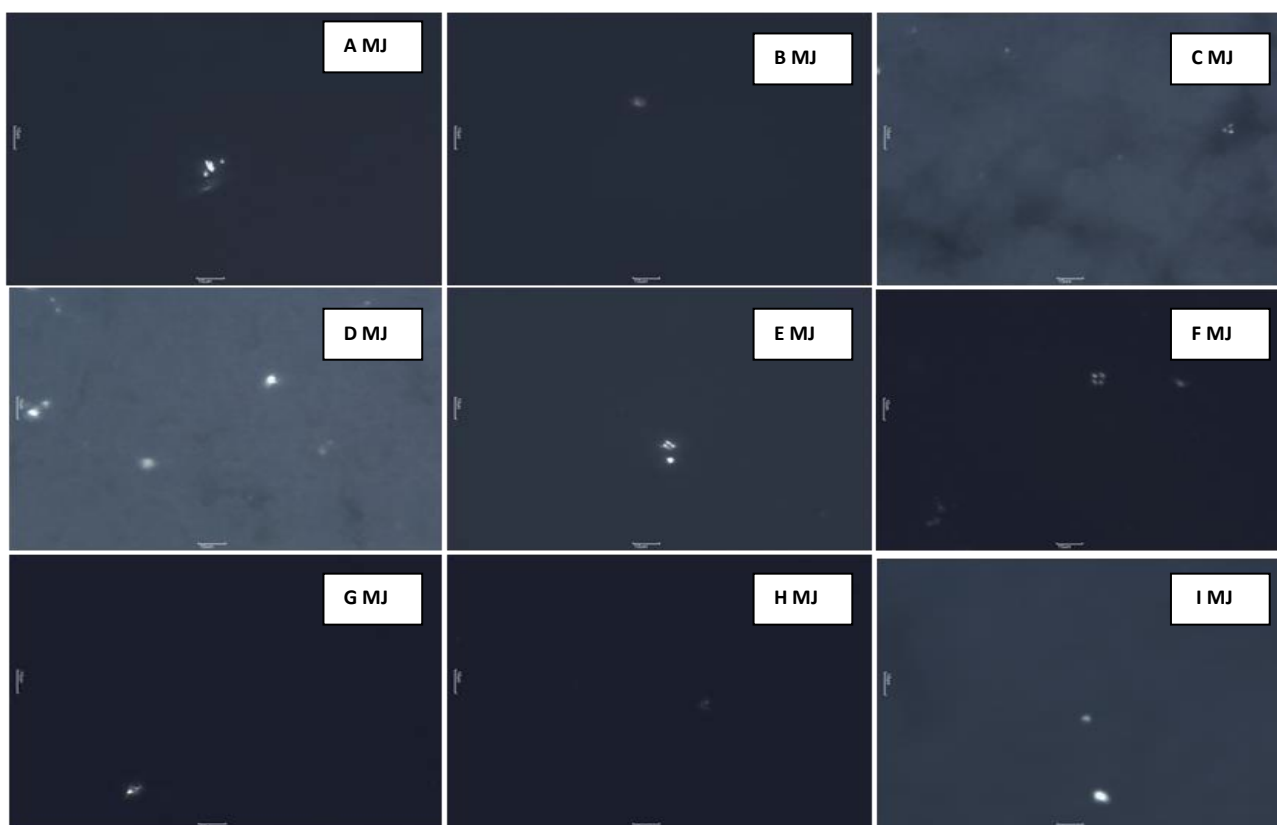


Figura 15. Fotomicrografias das formulações preparadas com proporções crescentes de fase oleosa (A: 2,5%, B: 10%, C: 18%, D: 24% e E: 30%) e tensoativo constante (20%) e com proporções crescentes de tensoativo (F: 6%, G: 10%, H: 15%, C: 20% e I: 25%) e fase oleosa constante (18%), na presença de 20% de MJ.

A Figura 16 mostra as fotomicrografias das formulações com aumento da proporção de MJ (4 a 20%). Em baixas proporções de MJ as formulações apresentaram campo escuro com rara presença de cruz de malta, indicando isotropia. Já com aumento da proporção de MJ as fotomicrografias apresentaram diversas cruces de malta e deixam de apresentar campo escuro. A grande presença de cruces de malta indica fase lamelar

e, portanto anisotropia em altas concentrações de MJ. Quando o campo deixa de ser escuro indica formação de novas estruturas como emulsão, o que pode ser verificado pelo raio hidrodinâmico maior, como mostra a Tabela 5 em altas concentrações de MJ.

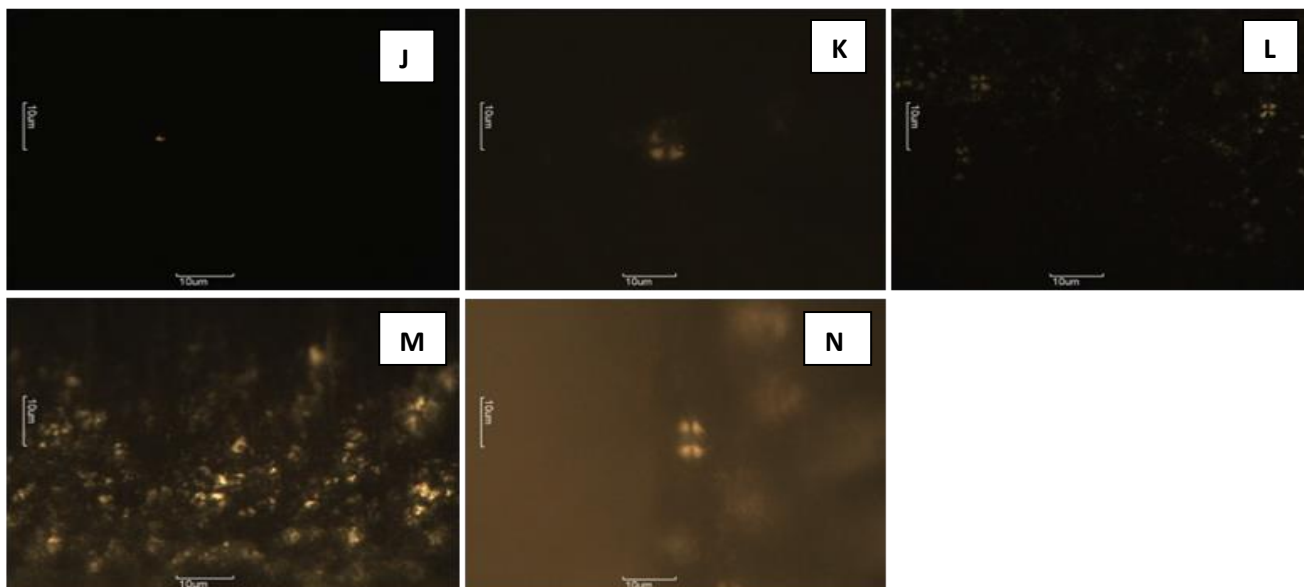


Figura 16. Fotomicrografias das formulações preparadas com proporções crescentes de MJ (J: 2,5%, K: 10%, L: 18%, M: 24% e N: 30%).

A Figura 17 mostra as fotomicrografias das formulações em que o MJ foi utilizado como fase oleosa. Na mais baixa proporção de MJ (2,5%) a fotomicrografia apresentou campo escuro, porém com o aumento de MJ as fotomicrografias apresentaram diversas gotas de óleo. Estas gotas são correspondentes ao MJ já que estas aumentaram à medida que aumentou-se a proporção do fármaco utilizado nestas formulações. A formulação de maior porcentagem de MJ (30%) além de apresentar diversas gotas de óleo, também apresentou algumas cruzes de malta.

As formulações com variação da proporção de tensoativo apresentaram fotomicrografias com gotas de óleo, mais evidentes nas formulações de menor

porcentagem de tensoativo (6 a 10%). Quando a proporção de tensoativo foi aumentada, isto é, a partir de 15%, o campo voltou a ser escuro e as gotas de MJ diminuíram. Isto deve ter ocorrido, pois o aumento de tensoativo pode ter diminuído a tensão interfacial destas formulações de modo a adquirir maior estabilidade termodinâmica. A formulação de maior porcentagem de tensoativo também apresentou raras cruces de malta.

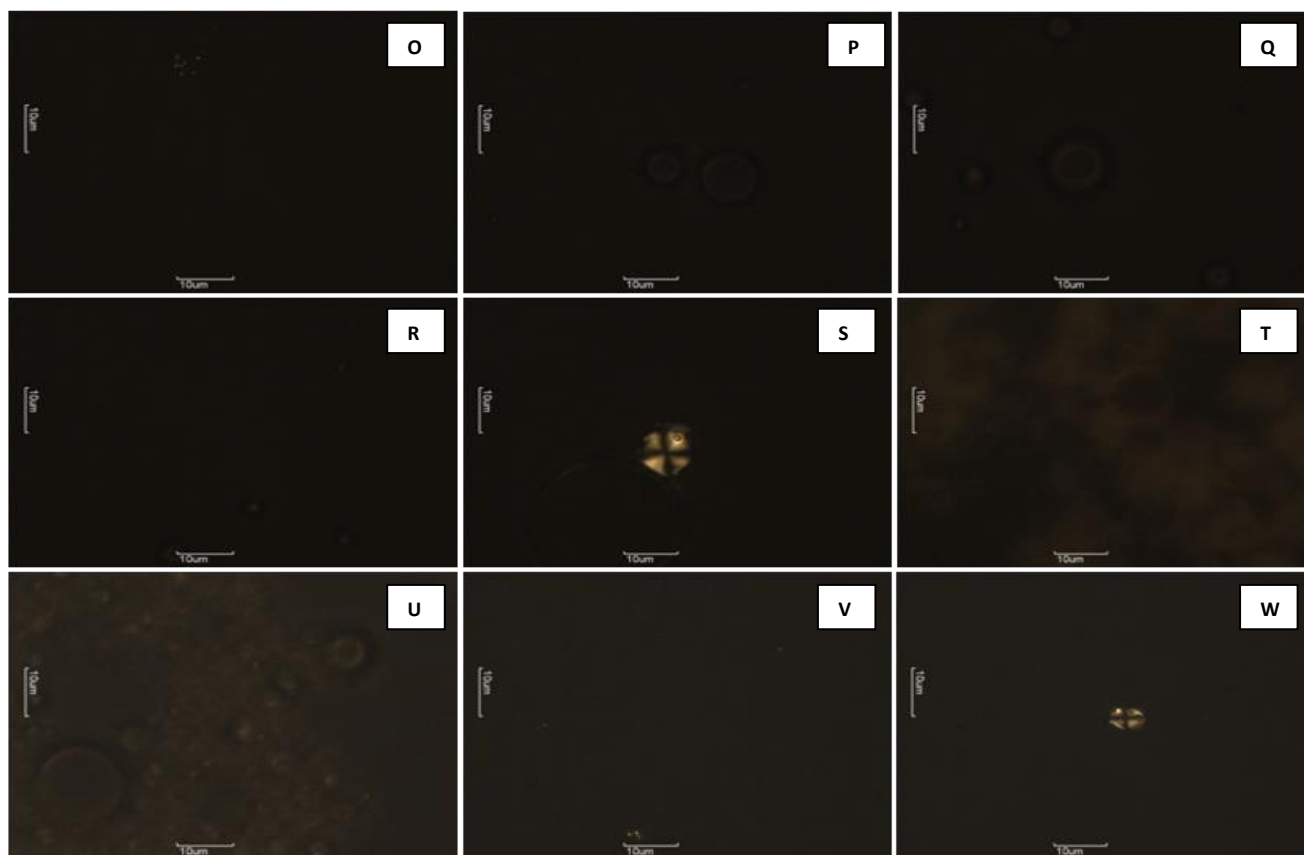


Figura 17. Fotomicrografias das formulações preparadas com proporções crescentes de MJ como fase oleosa (O: 2,5%, P: 10%, Q: 18%, R: 24% e S: 30%) e tensoativo constante (20%) e com proporções crescentes de tensoativo (T: 6%, U: 10%, V: 15%, Q: 20% e W: 25%) e MJ como fase oleosa constante (18%).

As gotas de óleo encontradas nas fotomicrografias com variação na proporção de MJ como fase oleosa são evidentemente correspondentes ao MJ. Essas gotas indicam

instabilidade destes sistemas na tentativa de utilizar apenas o MJ como fase oleosa, ou seja, o MJ sem o auxílio de outra fase oleosa capaz de incorporá-lo satura-se até mesmo em baixas concentrações. Essa instabilidade não é apenas comprovada pela microscopia de luz polarizada, mas também pelo alto raio hidrodinâmico destas formulações (Tabela 5).

Difração de Raios-X

Na Figura 18 estão representados os difratogramas de todos os componentes das formulações.

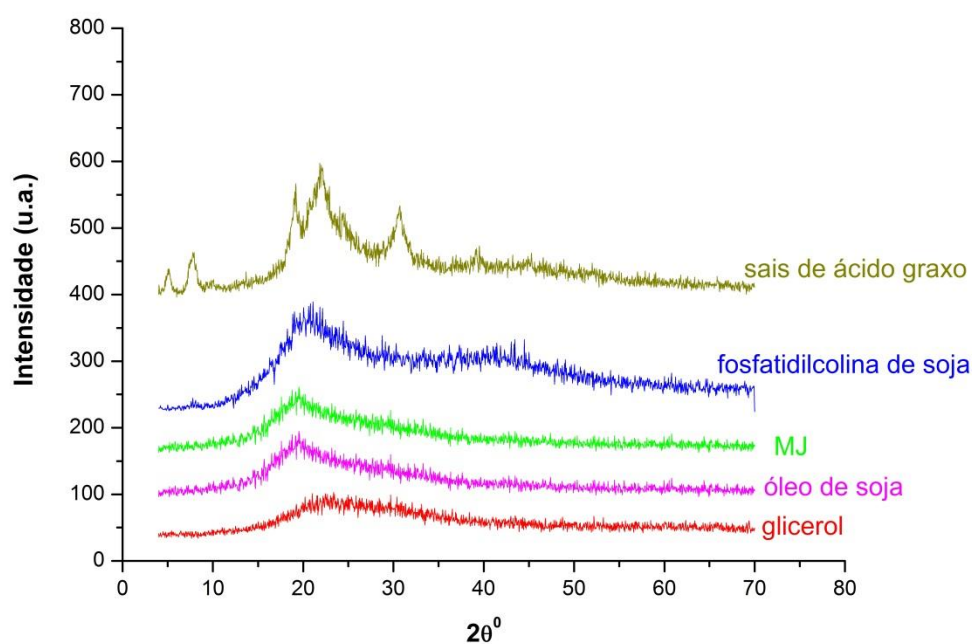


Figura 18. Difratogramas dos componentes isolados: sais de ácido graxo, fosfatidilcolina de soja, metildiidrojasmonato, óleo de soja e glicerol.

Na Figura 18, podemos observar que os componentes das formulações apresentam estruturas amorfas, com exceção do sal de ácido graxo, que apresenta

estrutura cristalina, identificada pelos picos nas seguintes posições: 5,17; 7,70; 19,24; 21,77; 30,98; 39,45; 45,40. O fato de o sal de ácido graxo apresentar estrutura cristalina, como mostra o difratograma acima, concomitantemente com a informação de que a mistura de ácidos graxos e seus sais na presença de água seja capaz de gerar estruturas em bicamadas (XU *et al.*, 2013) será de extrema importância para definição posterior das formulações.

Na Figura 19 estão representados os difratogramas das formulações com variação na proporção de fase oleosa na ausência de MJ e presença de MJ.

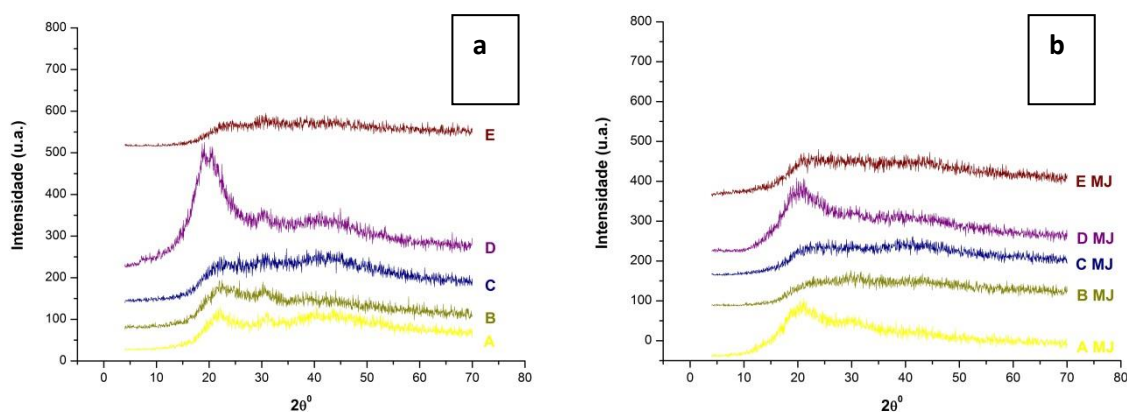


Figura 19. Difratogramas das formulações preparadas com proporções crescentes de fase oleosa (A: 2,5%, B: 10%, C: 18%, D: 24% e E: 30%) e tensoativo constante (20%) na ausência (a) e presença (b) de MJ.

Na Figura 19a pode-se observar que as formulações com variação de proporção de fase oleosa na ausência de MJ apresentaram halos alargados e pouco intensos. Porém é possível identificar picos de cristalinidade nas formulações com 2,5% até 24% de fase oleosa (A-D). Estes picos de cristalinidade são oriundos dos sais de ácido graxo, tendo em vista que nos difratogramas das formulações A, B e C dois picos coincidem com os picos deste tensoativo, enquanto na formulação com 24% de fase oleosa (D) três picos

coincidem com os deste tensoativo. A formulação de maior proporção de fase oleosa (E: 30% O) apresentou características de estrutura amorfa. Na Figura 19b na presença de MJ e com variação de proporção de fase oleosa notam-se também halos alargados e menos intensos. Nas formulações com 2,5% e 24% de fase oleosa (A e D) na presença de MJ observam-se dois picos que indicam cristalinidade e cujas posições coincidem com os picos do difratograma dos sais de ácidos graxos. As outras formulações na presença do fármaco (B, C e E) aparentam ser amorfas.

Não houve influência do aumento de proporção de fase oleosa nos difratogramas das formulações, independente da presença ou ausência de MJ.

Na Figura 20 estão representados os difratogramas das formulações com variação da proporção de tensoativo na presença e ausência de MJ.

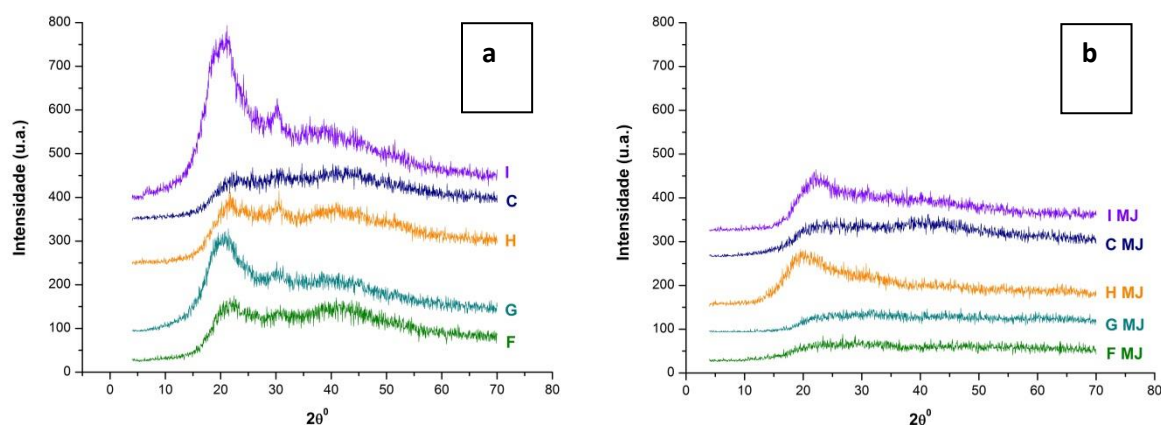


Figura 20. Difratogramas das formulações preparadas com proporções crescentes de tensoativo (F: 6%, G: 10%, H: 15%, C: 20% e I: 25%) e fase oleosa constante (18%), na ausência (a) e presença (b) de MJ.

Na Figura 20a foi possível observar os difratogramas das formulações com variação da proporção de tensoativo na ausência de MJ. Os difratogramas apresentaram halos largos e pouco intensos nas formulações de baixa proporção de tensoativo, com o

aumento da proporção de tensoativo os halos tornaram-se mais intensos principalmente na formulação de maior proporção de tensoativo. Nota-se que todas as formulações apresentaram dois picos de cristalinidade que coincidem com picos produzidos pelos sais de ácido graxo nos difratogramas. Com a adição do fármaco (figura 20b) nota-se que todos os halos tornaram-se menos intensos, o que torna estas estruturas mais amorfas na presença do MJ. Apenas as formulações com 15 e 25% de tensoativo na presença de MJ apresentam um pico que indica cristalinidade.

Ao comparar as figuras 19 e 20, observa-se que em independente de aumento de proporção de fase oleosa ou de tensoativo, quando fármaco é incorporado à maioria das formulações, estas deixam de ser cristalinas e passam a ser amorfas, isto significa que a cristalização dos sais de ácido graxo é desfavorecida quando MJ é incorporado ao sistema, tendo em vista que os halos tornam-se menos intensos e mais alargados.

Na Figura 21 estão representados os difratogramas das formulações em que a proporção de MJ sofreu variação.

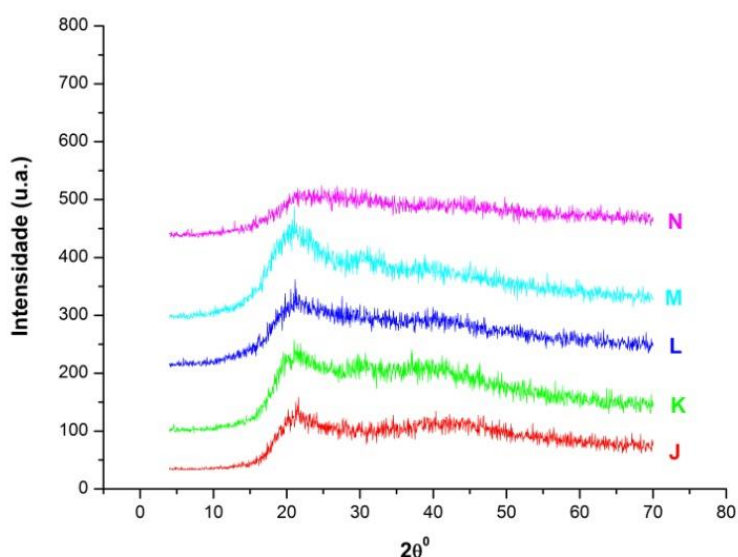


Figura 21. Difratograma das formulações preparadas com proporções crescentes de MJ (J: 2,5%, K: 10%, L: 18%, M: 24% e N: 30%).

Na Figura 21, nota-se que nas formulações onde a proporção de MJ foi variada (2,5 a 24% MJ) houve formação de halos pouco intensos e alargados em todas estas formulações, porém dois picos coincidem com os picos dos sais de ácido graxo, indicando cristalinidade destas estruturas. Já na formulação de maior porcentagem de MJ (30%) este pequeno halo desaparece. Não houve interferência do aumento de MJ na estrutura das formulações até determinada proporção de MJ (24%), apenas a formulação com maior porcentagem de MJ (30%) mostra um aumento de amorficidade.

Na Figura 22 estão representados os difratogramas das formulações onde o MJ foi utilizado como fase oleosa.

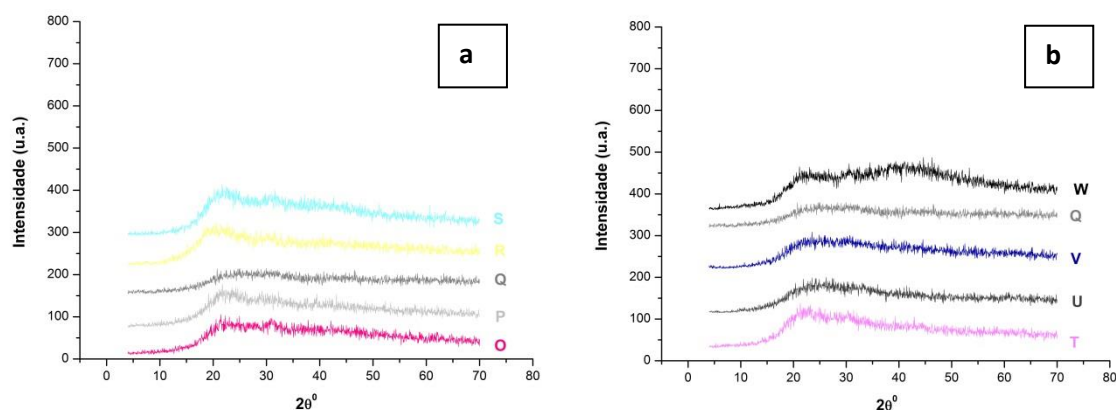


Figura 22. Difratogramas das formulações preparadas com: (a) proporções crescentes de MJ como fase oleosa (O: 2,5%, P: 10%, Q: 18%, R: 24% e S: 30%) e tensoativo constante (20%) e com: (b) proporções crescentes de tensoativo (T: 6%, U: 10%, V: 15%, Q: 20% e W: 25%) e MJ como fase oleosa constante (18%) (b).

Na Figura 22a observa-se que os difratogramas das formulações que sofreram variação da proporção de MJ (como fase oleosa) apresentaram halos pouco intensos e alargados, sendo que o difratograma da formulação com 18% de MJ este halo não

existe, deixando evidente que estas formulações apresentaram estruturas amorfas independente do aumento de MJ como fase oleosa. Na Figura 22b ocorre variação da proporção de tensoativo e há um halo pouco intenso e largo no difratograma da formulação de menor proporção de tensoativo, mas este vai diminuindo à medida que se aumenta o tensoativo. Porém em todos os casos, as estruturas são amorfas, devido à ausência de picos cristalinos de alta intensidade.

Para administração de injetáveis é muito importante saber se os sistemas são amorfos ou cristalinos e a predominância de amorficidade nas formulações estudadas é uma característica comum e desejada para sistemas injetáveis emulsionados (SILVA *et al.*, 2013).

Espalhamento de raios-X a baixo ângulo (SAXS)

Foi realizado o estudo de Espalhamento de raios-X a baixo ângulo, como mostram as curvas de intensidade de espalhamento $I(q)$ em função do vetor de espalhamento (q), em relação à variação de fase oleosa na ausência e presença de MJ (Fig. 23), em relação à variação da proporção de tensoativo na ausência e presença de MJ (Fig. 24), em relação à variação de MJ (Fig. 25) e em duas formulações em que MJ foi utilizado como fase oleosa (Fig. 26).

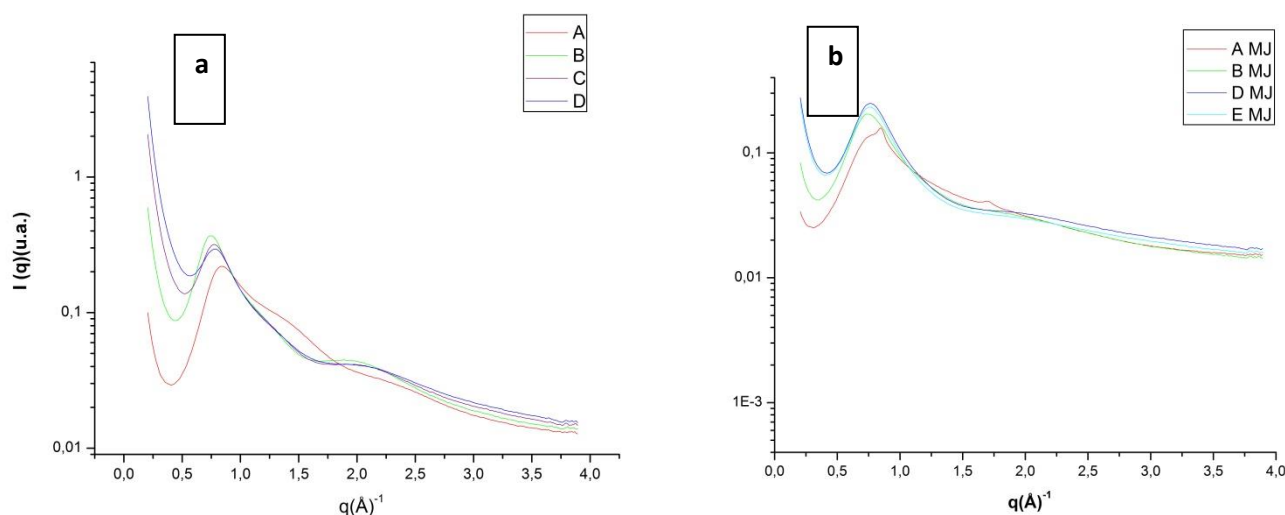


Figura 23. Curvas de SAXS das formulações preparadas com proporções crescentes de fase oleosa (A: 2,5%, B: 10%, C: 18%, D: 24% e E: 30%) e tensoativo constante (20%) na ausência (a) e presença (b) de MJ respectivamente.

A Figura 23a, mostra as curvas de SAXS das formulações com variação da fase oleosa na ausência de MJ. Foi possível observar a presença de um único pico na formulação de menor proporção de fase oleosa. Nesta formulação A (2,5% óleo de soja) foi possível observar um braço ligado ao único pico, sugerindo uma possível transição de fase de um sistema menos organizado para um sistema mais organizado. Com aumento da proporção de fase oleosa ocorreu surgimento de um segundo pico. A distância desses dois picos foi de aproximadamente 2 como mostra a Tabela 8 e esta distância sugere a presença de partículas ou agregados com organização espacial.

A Figura 23b mostra o que ocorre quando o fármaco foi incorporado com variação da proporção de fase oleosa. Todas as curvas apresentaram um único pico, com exceção da formulação de menor proporção de fase oleosa que apresentou um segundo pico. Isto significa que a adição do fármaco com o aumento de fase oleosa gerou uma

desestruturação das formulações. As formulações que apresentaram dois picos e, portanto são mais organizadas do ponto de vista estrutural (as formulações de maior proporção de fase oleosa na ausência de MJ e a formulação de baixa proporção de fase oleosa na presença de MJ) podem ser classificadas como uma mesofase lamelar devido à relação $d_1/d_2=2$ (CARVALHO, 2009).

A Figura 24 mostra as curvas de SAXS das formulações com variação da proporção de tensoativo na ausência e presença de MJ.

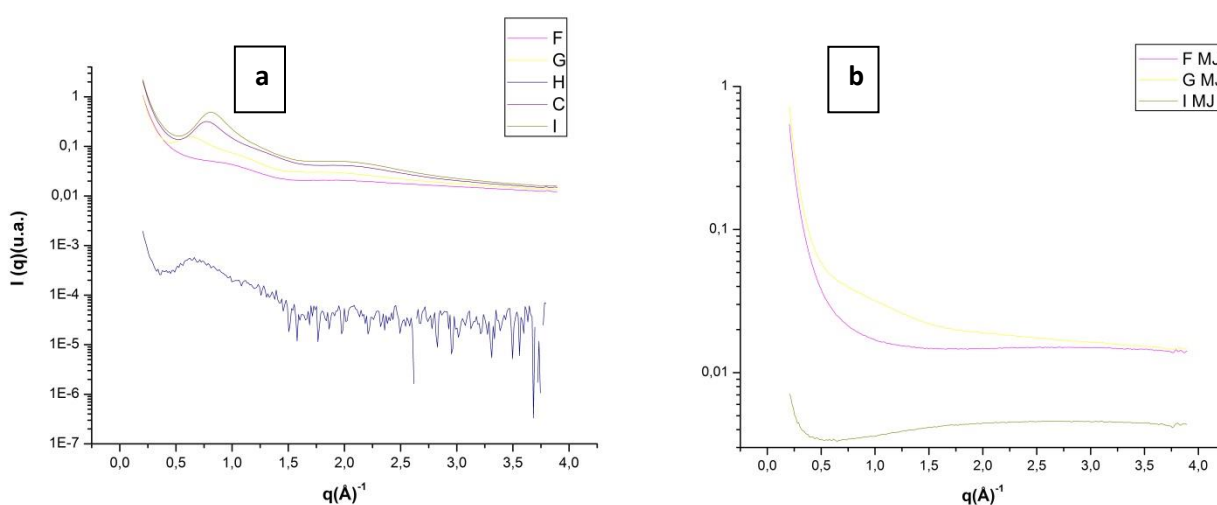


Figura 24. Curvas de SAXS das formulações preparadas com proporções crescentes de tensoativo (F: 6%, G: 10%, H: 15%, C: 20% e I: 25%) e fase oleosa constante (18%), na ausência (a) e presença (b) de MJ respectivamente.

Na Figura 24a, nota-se que em baixas porcentagens de tensoativo na ausência de MJ, um primeiro pico ainda está sendo formado. A curva da formulação de 15% de tensoativo apesar do ruído mostra o surgimento do primeiro pico, o que fica mais evidente nas formulações de maior porcentagem de tensoativo. Nestas formulações de maior porcentagem de tensoativo e ausência de MJ foi possível observar um segundo pico começando a aparecer. O aparecimento deste segundo pico decorrente do aumento de proporção de tensoativo indica maior organização estrutural. As formulações que

apresentaram dois picos podem ser classificadas como uma mesofase lamelar devido à relação $d_1/d_2=2$. As que apresentaram apenas um pico (baixas proporções de tensoativo na ausência de MJ) podem ser classificadas com micro ou nanoemulsões como observado também através da microscopia de luz polarizada, onde estas formulações apresentaram campo escuro indicando isotropia e o raio hidrodinâmico das gotículas variou de 106 a 185 nm indicando ainda raio hidrodinâmico coerente com estas estruturas.

Já quando MJ foi adicionado a estas formulações com variação da proporção de tensoativo (Fig. 24b) notam-se curvas sem picos. O fármaco alterou significativamente as nanoestruturas existentes, independentemente da proporção de tensoativo. O MJ apresenta caráter anfifílico e moléculas anfifílicas podem se inserir nos espaços entre as lamelas provocando o desaparecimento das propriedades estruturais do sistema (PESTANA, 2009), demonstrado também pelo campo escuro da microscopia de luz polarizada e pelo reduzido diâmetro de gotículas de 72 a 102 nm.

A Figura 25 mostra as curvas de SAXS das formulações com variação de MJ.

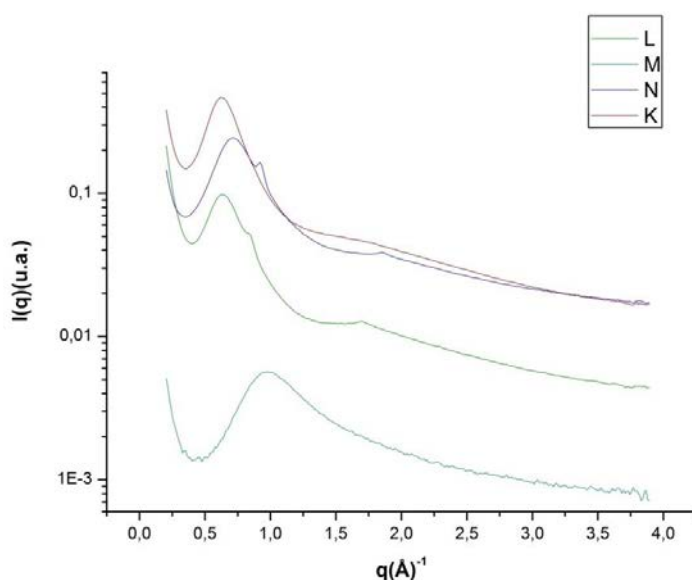


Figura 25. Curvas de SAXS das formulações preparadas com proporções crescentes de MJ (K: 8%, L: 12%, M: 16% e N: 20%).

Em todas as curvas com variação de MJ há presença de um primeiro pico intenso. À medida que a proporção de MJ foi aumentando um segundo pico apareceu. Os dados da Tabela 9 mostram que as formulações que apresentaram dois picos (12% e 20% de MJ) podem ser classificadas como mesofase lamelar devido à relação $d_1/d_2=2$. A formulação com baixa proporção de MJ (8%) pode ser uma micro ou nanoemulsão pelas características da curva de SAXS (apenas um pico) e pelo campo escuro através da técnica de microscopia de luz polarizada referente a um sistema isotrópico.

A Figura 26 mostra as curvas das formulações onde MJ foi utilizado como fase oleosa.

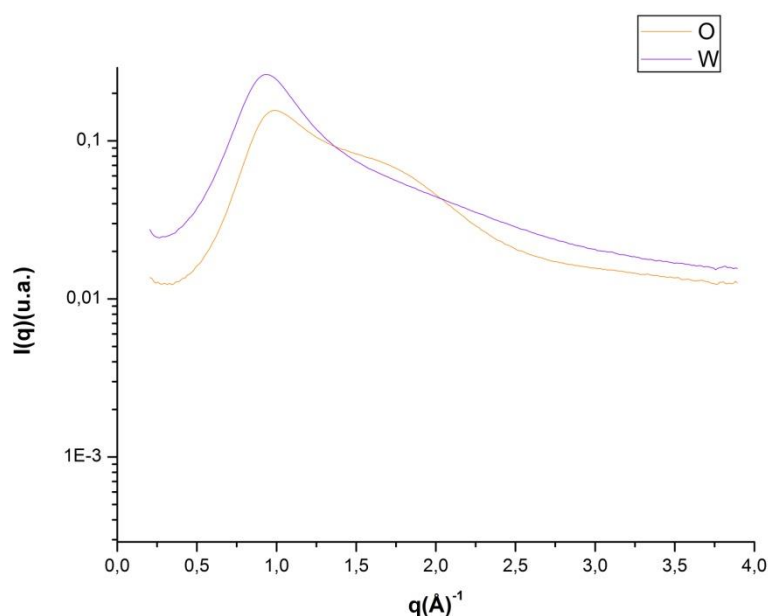


Figura 26. Curvas de SAXS das formulações O: 2,5% de MJ como fase oleosa e 20% de tensoativo e formulação W: 25% de tensoativo e 18% de MJ como fase oleosa.

Na Figura 26, observa-se que a formulação com baixa proporção de MJ como fase oleosa (formulação O) obteve uma curva de SAXS com um único pico alargado e com um braço que se estende ao pico. Através deste único pico entende-se que a formulação pode ser uma nanoemulsão por apresentar raio hidrodinâmico médio de gotículas de 229 nm e campo escuro na microscopia de luz polarizada. Já formulação com alta proporção de tensoativo e com MJ como fase oleosa pode ser uma emulsão, pois apesar de apresentar um único pico obteve raio hidrodinâmico médio de gotículas maior que 1200 nm.

Tabela 8. Valores de q_{max} (Å) e razão entre as distâncias interplanares para as formulações com variação de fase oleosa e variação de tensoativo na ausência e presença de MJ.

	$q_{max 1}$ (Å)	$q_{max 2}$ (Å)	d1/d2		$q_{max 1}$ (Å)	$q_{max 2}$ (Å)	d1/d2
A	0,84	-	-	A MJ	0,84	1,69	2
B	0,75	1,97	2	B MJ	0,75	-	-
C	0,77	2,05	2				
D	0,78	2,05	2	D MJ	0,66	-	-
				E MJ	0,75	-	-
F	0,95	-	-	F MJ	sem	pico	
G	0,62	-	-	G MJ	sem	pico	
H	0,82	-	-				
C	0,77	2,05	2				
I	0,81	2,00	2	I MJ	sem	pico	

Tabela 9. Valores de q_{max} (Å) e razão entre as distâncias interplanares para as formulações com variação de MJ ou formulações onde MJ foi utilizado como fase oleosa.

	$q_{max\ 1}(\text{Å})$	$q_{max\ 2}(\text{Å})$	d1/d2
K	0,63	-	-
L	0,63	1,69	2
M	0,98	-	-
N	0,71	1,85	2
O	0,99	-	-
W	0,93	-	-

Potencial Zeta

Quando as partículas estão em contato com um líquido elas adquirem uma carga elétrica na sua superfície. O potencial de superfície das partículas fornece os valores de potencial zeta. Este sofre influência das modificações na interface com o meio dispersante, em razão da dissociação de grupos funcionais na superfície da partícula ou da adsorção de espécies iônicas presentes no meio aquoso de dispersão. Podemos determinar o potencial zeta através de técnicas de eletroforese. O potencial zeta pode ser influenciado pelo tensoativo usados nas formulações. Tensoativo aniônico gera um potencial negativo à interface, enquanto tensoativo não-iônicos reduzem o valor absoluto deste parâmetro. Sabe-se que uma boa estabilidade fisico-química das dispersões coloidais é garantida quando se obtém em módulo, um valor de potencial zeta relativamente alto já que forças repulsivas grandes evitam a agregação em função

das colisões ocasionais de nanopartículas ou gotículas adjacentes (KILL, 2012; SOUZA, 2011; SCHAFFAZICK *et al.*, 2003).

A Tabela 10 mostra os valores de potencial zeta obtidos nas formulações com variação de fase oleosa ou variação de tensoativo na ausência e presença de MJ.

Tabela 10. Potencial zeta das formulações com variação de fase oleosa e formulações com variação de tensoativo na ausência e presença de MJ.

Formulações	Potencial Zeta (mV)	Formulações	Potencial Zeta (mV)
A (2,5%O, 20%T)	-99,00	AMJ (2,5%O, 20%T)	-21,90
B (10%O, 20%T)	-109,00	BMJ (10%O, 20%T)	-57,10
C (18%O, 20%T)	-109,00	CMJ (18%O, 20%T)	-75,80
D (24%O, 20%T)	-109,00	DMJ (24%O, 20%T)	-75,90
E (30%O, 20%T)	-113,00	EMJ (30%O, 20%T)	-59,20
F (18%O, 6%T)	-78,60	FMJ (18%O, 6%T)	-81,00
G (18%O, 10%T)	-84,00	GMJ (18%O, 10%T)	-63,60
H (18%O, 15%T)	-99,50	HMJ (18%O, 15%T)	-53,20
C (18%O, 20%T)	-109,00	CMJ (18%O, 20%T)	-75,80
I (18%O, 25%T)	-91,60	IMJ (18%O, 25%T)	-44,50

A Tabela 11 mostra os valores obtidos de potencial zeta das formulações com variação de MJ e das formulações onde MJ foi utilizado como fase oleosa.

Tabela 11. Potencial zeta das formulações com variação de MJ e das formulações onde MJ foi utilizado como fase oleosa.

Formulações	Potencial Zeta (mV)	Formulações	Potencial Zeta (mV)
J (4%MJ)	-92,90	T (18%MJ, 6%T)	-47,30
K (8%MJ)	-82,00	U (18%MJ, 10%T)	-54,90
L (12%MJ)	-74,30	V (18%MJ, 15%T)	-85,90
M (16%MJ)	-17,80	Q (18%MJ, 20%T)	-99,50
N (20%MJ)	-1,97	W (18%MJ, 25%T)	-113,00
O (2,5%MJ, 20%T)	-20,50		
P (10%MJ, 20%T)	-106,00		
Q (18%MJ, 20%T)	-99,50		
R (24%MJ, 20%T)	-113,00		
S (30%MJ, 20%T)	-107,00		

A Figura 27 mostra a variação do potencial zeta em função do aumento de fase oleosa na ausência e presença de fármaco respectivamente (Fig. 27a e 27b) e do aumento da proporção de tensoativo na ausência e presença de MJ respectivamente (Fig. 27c e 27d).

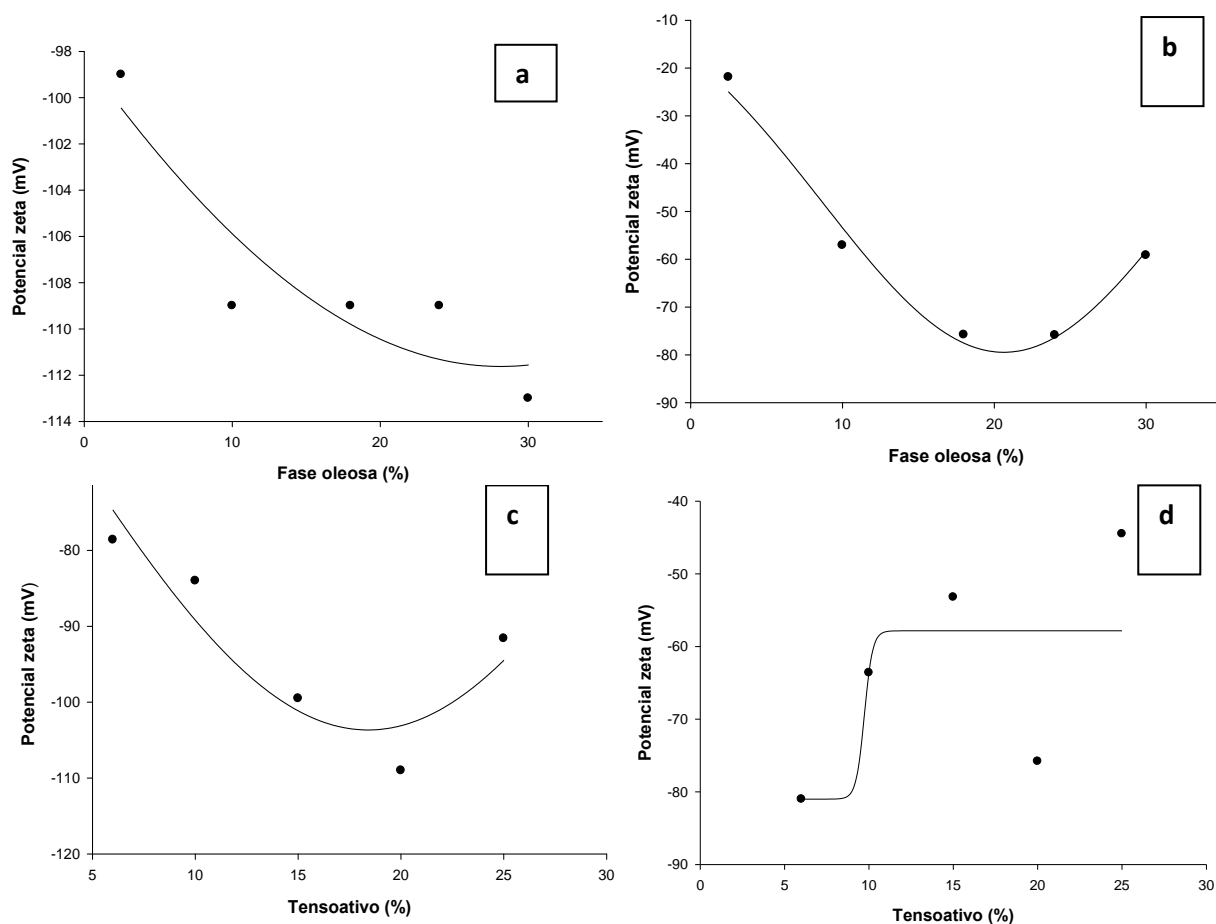


Figura 27. Variação do potencial zeta em função da fase oleosa: a) na ausência de fármaco; b) na presença de fármaco e em função da proporção de tensoativo: c) na ausência de fármaco e d) na presença de fármaco.

Na Figura 27a verifica-se que com aumento da proporção de fase oleosa na ausência de MJ o potencial zeta variou de -99,0 a -113,0 mV. Esta variação do potencial foi praticamente insignificante, tendo em vista que da formulação de 10% (B) até a formulação com 30% de fase oleosa (E) o potencial zeta foi praticamente constante.

Na Figura 27b podemos observar que com aumento da fase oleosa e presença de MJ o potencial zeta variou de -21,9 a -59,2 mV. Já com aumento da proporção de tensoativo e ausência de MJ, na Figura 27c foi possível observar a variação do potencial

zeta de -78,6 até -91,6 mV. Este aumento do potencial negativo se dá devido à presença dos sais de ácidos graxos no sistema de tensoativo, tendo em vista que estes sais apresentam cargas negativas. Na Figura 27d ocorreu variação do potencial com aumento de tensoativo na presença de MJ, de -81,0 até -44,5 mV. A adição do fármaco (Fig. 27b e 27d) gerou uma queda, em módulo, nos valores de todas as formulações, o que pode indicar uma possível interação eletrostática entre o fármaco e o filme interfacial (SCHAFFAZICK *et al*, 2003). Como o MJ é neutro, a adição dele a estas formulações provoca uma diluição no meio tornando o sistema menos negativo, isto é, diluindo ou diminuindo a carga negativa gerada pelos sais de ácido graxo do sistema tensoativo.

A Figura 28 mostra a variação do potencial zeta em função do aumento de MJ (Fig. 28a), do aumento de MJ como fase oleosa (Fig. 28b) e do aumento da proporção de tensoativo (Fig. 28c).

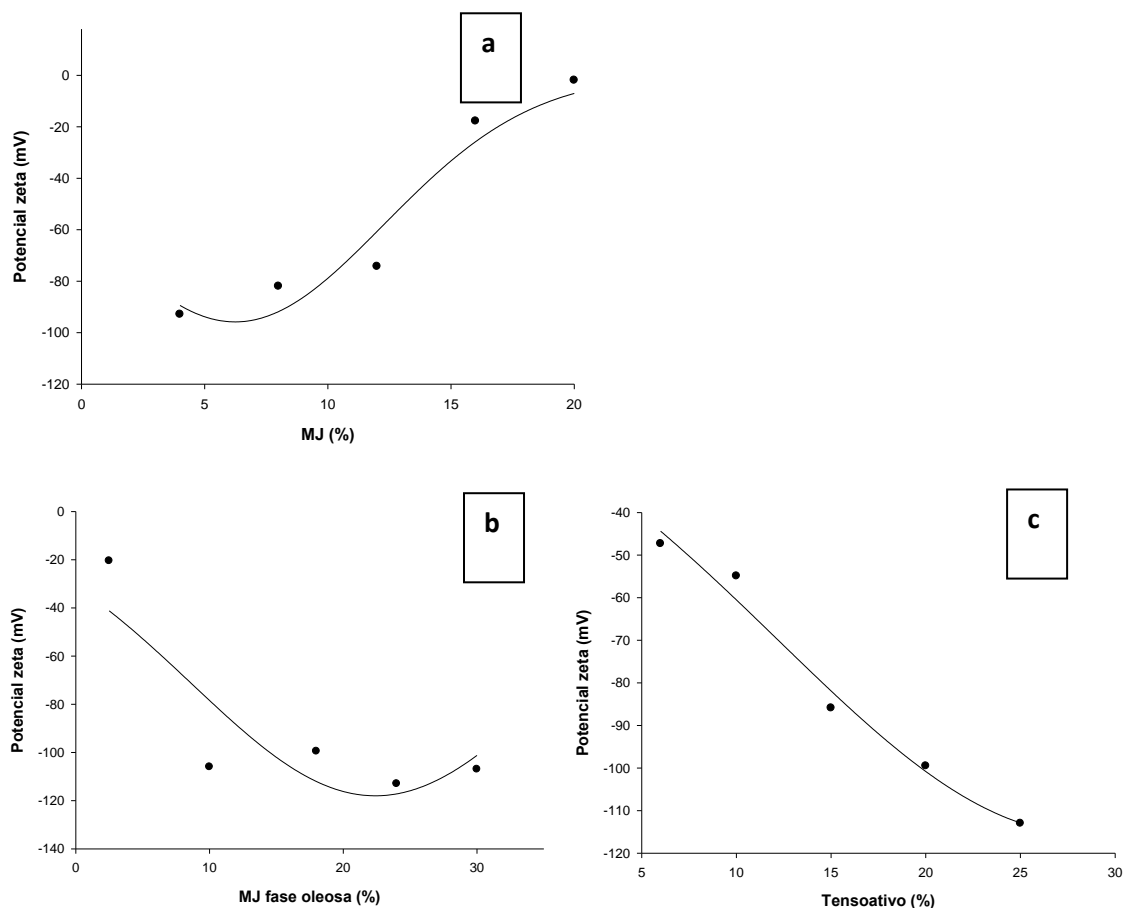


Figura 28. Variação do potencial zeta em função: a) do aumento do metiljamonato como fármaco; b) do aumento da proporção de fármaco como fase oleosa; c) em função do aumento da proporção de tensoativo.

Na Figura 28a fica evidente com o aumento do MJ de 4 a 30%, o potencial zeta sofreu variação de -92,9 para -1,97 mV. Ficando novamente evidente que o MJ por ser neutro dilui o meio ao qual foi adicionado à medida que sua concentração aumenta reduzindo assim a carga negativa gerada pelos sais de ácido graxos do tensoativo.

Já com o aumento de MJ como fase oleosa na ausência de óleo de soja, o potencial zeta variou de -20,5 até -107,0 mV. Com o aumento da proporção de tensoativo ocorreu variação do potencial de -47,3 até -113,0 mV. Este aumento do valor negativo à medida que aumentamos o tensoativo é sinal da presença dos sais de ácido

graxo no sistema tensoativo que apresentam carga negativa.

Praticamente todos os valores de potencial zeta obtidos foram altos em módulo, garantindo uma boa estabilidade das dispersões coloidais.

4.3 Definição das formulações

Após análise do aspecto visual de todas as formulações e correlação entre a caracterização físico-química destas, desenvolvemos esse tópico com o objetivo de classificar as formulações em microemulsões, nanoemulsões, emulsões ou outras formas farmacêuticas adequadas.

As características físico-químicas e aspecto visual das formulações: na ausência e presença de MJ com variação de proporção de fase oleosa ou de tensoativo estão resumidos na Tabela 12 e 13, respectivamente. As características físico-químicas e aspecto visual das formulações com variação de MJ e das formulações que possuem MJ como fase oleosa estão resumidos na Tabela 14 e 15, respectivamente.

As formulações A, E, G (Tabela 12) e F MJ, G MJ, H MJ (Tabela 13) e J, K (Tabela 14) foram definidas como microemulsões, tendo em vista que apresentam raio hidrodinâmico de gotículas reduzido, em torno de 100 nm, isotropia, ausência de pico ou um único pico no SAXS, além de serem sistemas líquidos transparentes.

As formulações F (Tabela 12), B MJ, C MJ, D MJ, E MJ e I MJ (Tabela 13), M (Tabela 14), O, Q, R e S (Tabela 15) foram classificadas como nanoemulsões, pois apresentam raio hidrodinâmico de gotículas em torno de 200 nm a 400 nm. Apresentam também isotropia, são sistemas líquidos e opacos e o SAXS é caracterizado por um único pico ou ausência deste.

As formulações como B, C, D, H e I (Tabela 12) e L (Tabela 14) apresentaram reduzido raio hidrodinâmico reduzido (menor que 200nm) e isotropia, com aspecto visual de líquido transparente, teoricamente estes sistemas podem ser definidos como microemulsões. Porém os resultados das análises de SAXS mostram a presença de dois picos nas amostras, típicos de sistemas com organização de bicamada ou lamelar. Além disso, os dados da difração de raios-X mostram a presença de picos alargados, mas bem definidos, sugerindo a presença de uma fase cristalina nessas formulações. Esta cristalinidade provavelmente é exibida devido à presença dos sais de ácido graxo que apresentaram estrutura cristalina no difratograma de raios-X. XU e colaboradores demonstram em seu trabalho que a interação de ácidos graxos e seus sais na presença de água é capaz de gerar estruturas em bicamadas (XU *et al.*, 2013). Neste estudo, a interação pode ser atribuída à mistura de sais de ácidos graxo, extraídos do óleo de coco, com óleo de soja, a fase oleosa, na presença da fase aquosa como meio dispersante. Esta estrutura de bicamada não exclui a possibilidade da existência de microemulsão. Assim estes sistemas foram definidos como microemulsão na presença de SAG lamelar. Na Tabela 13 ocorre fato semelhante com a formulação A MJ e na Tabela 14 com a formulação N, porém estas foram definidas como nanoemulsões na presença de SAG lamelar devido ao raio hidrodinâmico de 285 nm.

Já as formulações T, U e W (Tabela 15) foram classificadas como emulsões, tendo em vista o alto raio hidrodinâmico das gotículas, serem sistemas anisotrópicos e sistemas líquidos opacos além da formulação W apresentar um único pico nas curvas de SAXS.

Tabela 12. Caracterização físico-química, aspecto visual e definição das formulações na ausência de MJ.

Formulação	Composição	Aspecto visual	Raio (nm)	Reologia	MLP	Difração de raios-X	SAXS	Definição
A	2,5%O, 20%T e 77,5%A	STL	102,9	Newtoniano	Isotropia	Cristalina	1 pico	Microemulsão
B	10%O, 20%T e 70%A	STL	93,7	Tixotrópico	Isotropia	Cristalina	2 picos d=2	Microemulsão +SAG lamelar
C	18%O, 20%T e 62%A	STL	87,7	Pseudoplástico	Isotropia	Cristalina	2 picos d=2	Microemulsão +SAG lamelar
D	24%O, 20%T e 56%A	STL	74,2	Reopético	Isotropia	Cristalina	2 picos d=2	Microemulsão + SAG lamelar
E	30%O, 20%T e 50%A	STL	62,4	Reopético	Isotropia	Amorfa	-	Microemulsão
F	18%O, 6%T e 76%A	SOL	185,8	Tixotrópico	Isotropia	Cristalina	sem pico	Nanoemulsão
G	18%O, 10%T e 72%A	SOL	120,6	Pseudoplástico	Isotropia	Cristalina	1 pico	Microemulsão
H	18%O, 15%T e 67%A	SOL	106,0	Pseudoplástico	Isotropia	Cristalina	2 picos d=2	Microemulsão +SAG lamelar
I	18%O, 25%T e 57%A	STL	64,4	Anti-tixotrópico	Isotropia	Cristalina	2 picos d=2	Microemulsão +SAG lamelar

Tabela 13. Caracterização físico-química, aspecto visual e definição das formulações na presença de MJ.

Formulação	Composição	Aspecto visual	Raio (nm)	Reologia	MLP	Difração de raios-X	SAXS	Definição
A MJ	2,5%O, 20%T,77,5%A e 20% MJ	SOL	588,5	Pseudoplástico	Isotropia	Cristalina	2 picos d=2	Nanoemulsão +SAG lamelar
B MJ	10%O, 20%T,70%A e 20% MJ	SOL	219,7	Anti-tixotrópico	Isotropia	Amorfa	1 pico	Nanoemulsão
C MJ	18%O, 20%T,62%A e 20% MJ	SOL	223,3	Anti-tixotrópico	Anisotropia	Amorfa	-	Nanoemulsão
D MJ	24%O, 20%T,56%A e 20% MJ	SOL	205,4	Anti-tixotrópico	anisotropia	Cristalina	1 pico	Nanoemulsão
E MJ	30%O, 20%T,50%A e 20% MJ	SOL	320,4	Anti-tixotrópico	anisotropia	Amorfa	1 pico	Nanoemulsão
F MJ	18%O, 6%T,76%A e 20% MJ	STL	86,4	Reopético	isotropia	Amorfa	Sem pico	Microemulsão
G MJ	18%O, 10%T,72%A e 20% MJ	STL	72,4	Reopético	isotropia	Amorfa	Sem pico	Microemulsão
H MJ	18%O, 15%T,67%A e 20% MJ	STL	102,3	Reopético	isotropia	Cristalina	-	Microemulsão
I MJ	18%O, 25%T,57%A e 20% MJ	SOL	375,8	Anti-tixotrópico	anisotropia	Cristalina	Sem pico	Nanoemulsão

Tabela 14. Caracterização físico-química, aspecto visual e definição das formulações com variação da proporção de MJ.

Formulação	Composição	Aspecto visual	Raio (nm)	Reologia	MLP	Difração de raios-X	SAXS	Definição
J	23%O, 19%T,54%A e 4%MJ	STL	61,3	Newtoniano	Isotropia	Cristalina	-	Microemulsão
K	22%O, 18,5%T,51,5%A e 8%MJ	STL	88,5	Newtoniano	Isotropia	Cristalina	1 pico	Microemulsão
L	21%O, 17,5%T,49,5%A e 12%MJ	SOL	147,1	Anti-tixotrópico	Isotropia	Cristalina	2 picos d=2	Microemulsão +SAG lamelar
M	20%O, 17%T,47%A e 16%MJ	SOV	196,1	Anti-tixotrópico	Anisotropia	Cristalina	1 pico	Nanoemulsão
N	19%O, 16%T,45%A e 20%MJ	SOV	285,1	Anti-tixotrópico	Anisotropia	Amorfa	2 picos d=2	Nanoemulsão + SAG lamelar

Tabela 15. Caracterização físico-química, aspecto visual e definição das formulações contendo MJ como fase oleosa.

Formulação	Composição	Aspecto visual	Raio (nm)	Reologia	MLP	Difração de raios-X	SAXS	Definição
O	2,5%MJ, 20%T,77,5%A	SOL	229,9	Tixotrópico	Isotropia	Amorfa	1 pico	Nanoemulsão
P	10%MJ, 20%T,70%A	SOL	Nd	Pseudoplástico	Anisotropia	Amorfa	-	-
Q	18%MJ, 20%T,62%A	SOL	206,3	Pseudoplástico	Anisotropia	Amorfa	-	Nanoemulsão
R	24%MJ, 20%T,56%A	SOL	340,6	Pseudoplástico	Anisotropia	Amorfa	-	Nanoemulsão
S	30%MJ, 20%T,50%A	SOL	400,5	Anti-tixotrópico	Anisotropia	Amorfa	-	Nanoemulsão
T	18%MJ, 6%T,76%A	SOL	626,2	Tixotrópico	Anisotropia	Amorfa	-	Emulsão
U	18%MJ, 10%T,72%A	SOL	1299,0	Tixotrópico	Anisotropia	Amorfa	-	Emulsão
V	18%MJ, 15%T,67%A	SOL	nd	Tixotrópico	Anisotropia	Amorfa	-	-
W	18%MJ, 25%T,57%A	SOL	1241,0	Newtoniano	Anisotropia	Amorfa	1 pico	Emulsão

4.4 Determinação do MJ por cromatografia gasosa acoplada a detector por íon de chamas

A Figura 29 mostra o cromatograma obtido do MJ em metanol.

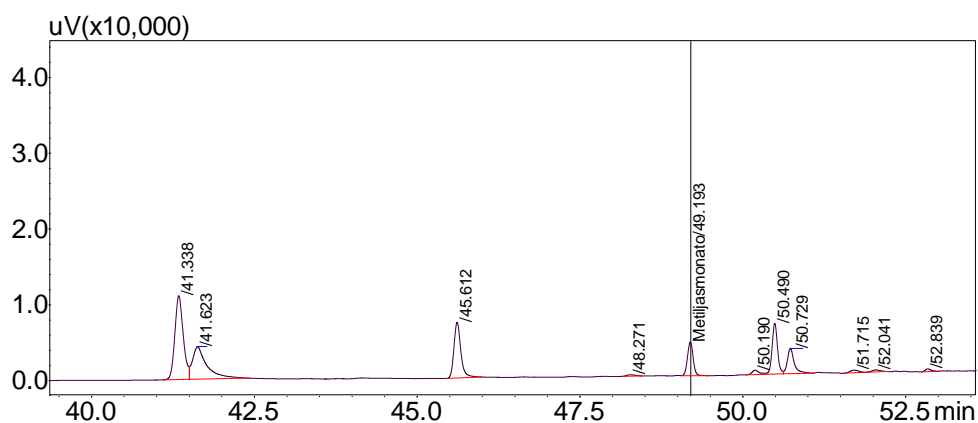


Figura 29. Cromatograma obtido do MJ em metanol por CG acoplado ao detector por íon de chamas.

O MJ apresentou tempo de retenção de aproximadamente 49,1 minutos.

Curva analítica do MJ em metanol

A Figura 30 mostra a curva analítica obtido do MJ em metanol.

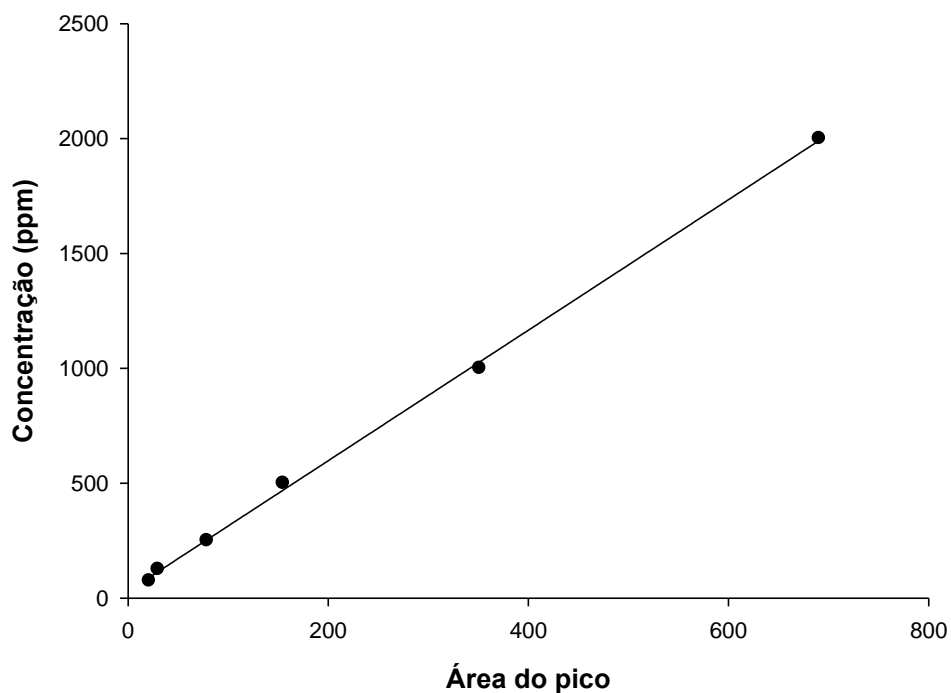


Figura 30. Curva analítica de MJ em metanol obtida por CG.

A equação linear representativa obtida através da curva analítica de MJ em metanol foi $y = 2,840383x + 30,01755$. O coeficiente de correlação foi de 0,9992359 demonstrando linearidade da curva analítica.

4.5 Ensaio de Liberação *in vitro*

Escolha dos sistemas estudados na liberação *in vitro*

Os sistemas selecionados para estudo de *liberação in vitro* foram escolhidos de acordo com resultados obtidos na caracterização físico-química. As formulações com variação da proporção de fase oleosa na presença de MJ (A MJ, B MJ, C MJ, D MJ e EMJ) e as formulações com variação na proporção de tensoativo na presença de MJ (F MJ, G MJ, H

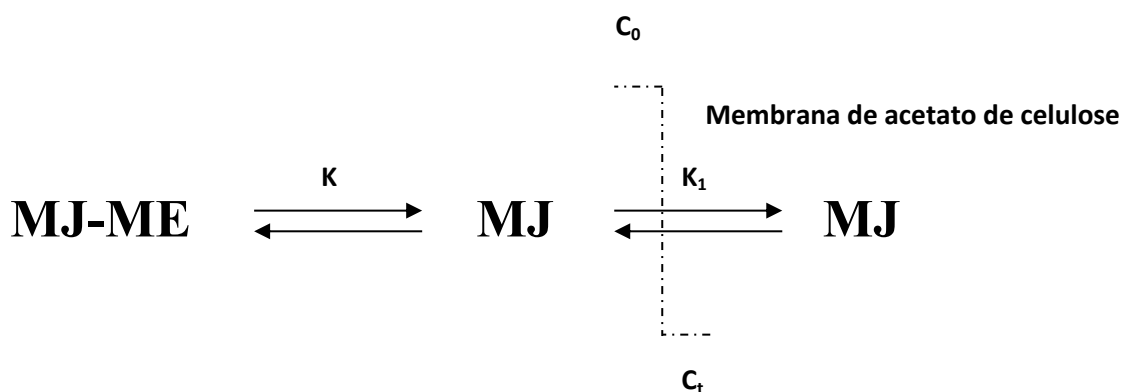
MJ, C MJ e I MJ) foram selecionadas para etapa da liberação *in vitro* tendo em vista que apresentaram: raio hidrodinâmico reduzidos de acordo com micro e nanoemulsões, sistemas amorfos ou cristalinos devido aos sais de ácido graxo de acordo com a difração de raios-X, campo escuro na microscopia de luz polarizada e curvas de SAXS coerentes com sistemas de micro e nanoemulsões. As formulações com variação de MJ foram descartadas por apresentarem praticamente a mesma formulação com alteração na concentração do fármaco e grande concentração de cruz de malta na microscopia de luz polarizada. As formulações onde MJ foi utilizado como fase oleosa também foram descartadas devido ao excesso de óleo (nesse caso o próprio MJ) na microscopia de luz polarizada e também devido aos elevados raios hidrodinâmicos obtidos.

Incorporação

Nas formulações selecionadas para esta etapa, foi adicionado MJ até que se observasse mudança do aspecto visual destas, como alteração da viscosidade e início da transição transparente para opaco. Foi adicionado um total de 20% de MJ em cada formulação, ou seja, 200 mg/g de preparação.

Para avaliar a liberação *in vitro* foi utilizado o modelo de difusão através da membrana (Esquema 1). No ensaio, inicialmente o meio receptor encontra-se totalmente livre de fármaco. Nos tempos iniciais de liberação (C_0) o fármaco deve estar contido nas gotículas da fase oleosa, ou seja, na fase interna das ME e NE. Nas fases posteriores o fármaco sai das gotículas e se acumula na superfície da membrana gerando um gradiente de concentração para a difusão. Nesta etapa o fármaco deve ser liberado da fase oleosa interna para fase aquosa externa das ME e NE. O fármaco deve se difundir através da membrana de acetato de celulose para o meio receptor, onde deve ser coletado e quantificado. Através esquema 1, a

difusão continua até que $C_o=C_t$, mas se a condição sink for mantida então C_t não deve ultrapassar 1/10 de C_o , desta forma o processo de liberação vai seguir até o esgotamento do fármaco. No caso de fármacos pouco solúveis no meio receptor, pode-se escolher um agente solubilizante como um tensoativo, para acelerar o processo de liberação. Neste caso foi escolhido o laurilsulfato de sódio 0,15%, para que a liberação do MJ a partir das ME e NE não fosse influenciada pela baixa solubilidade do fármaco no meio receptor (PESTANA, 2009).



Esquema 1: No qual C_o refere-se a concentração inicial de fármaco na membrana (tempo zero) e C_t refere-se a concentração de fármaco liberado num tempo t , K refere-se a constante de liberação do fármaco das gotículas para o meio externo da microemulsão e K_1 refere-se a constante de permeação do fármaco através da membrana.

Na Figura 31 pode-se observar o perfil de liberação do controle, uma solução micelar de MJ em tampão Tris-HCl, onde o laurilsulfato de sódio foi adicionado devido à insolubilidade do MJ em meio aquoso.

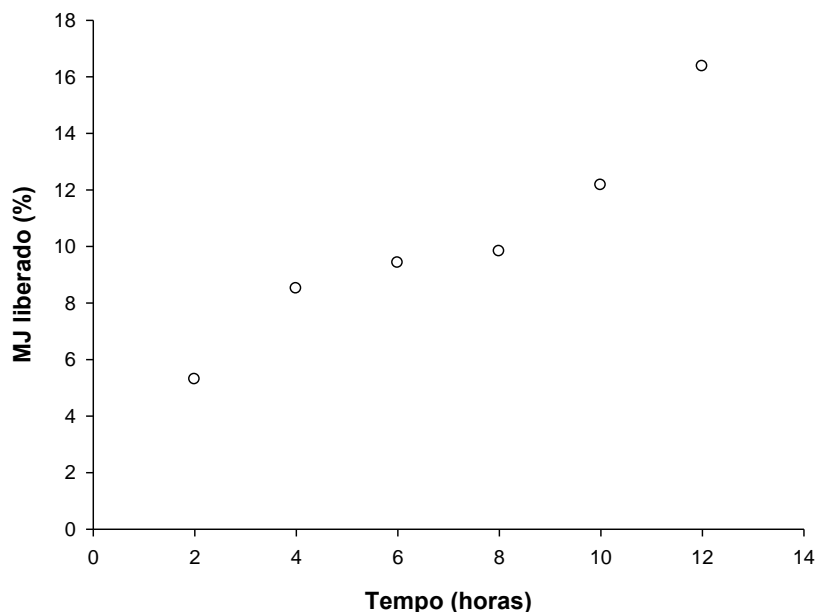


Figura 31. Perfil de liberação do MJ na solução micelar (tampão Tris-HCl acrescido de 0,15% laurilsulfato de sódio) contendo 20% de MJ.

O perfil de liberação do MJ a partir da solução micelar apresentou um efeito “burst” inicial que demonstra baixa interação do MJ a esta solução micelar. No tempo inicial de liberação (2 horas) mais de 5% de MJ já havia sido liberado. Ao efeito “burst” inicial segue-se uma fase de liberação regular.

A Figura 32 mostra o perfil de liberação de MJ a partir das formulações com variação da proporção de fase oleosa e a Figura 33 mostra o perfil de liberação de MJ a partir das formulações onde ocorre variação de proporção de tensoativo.

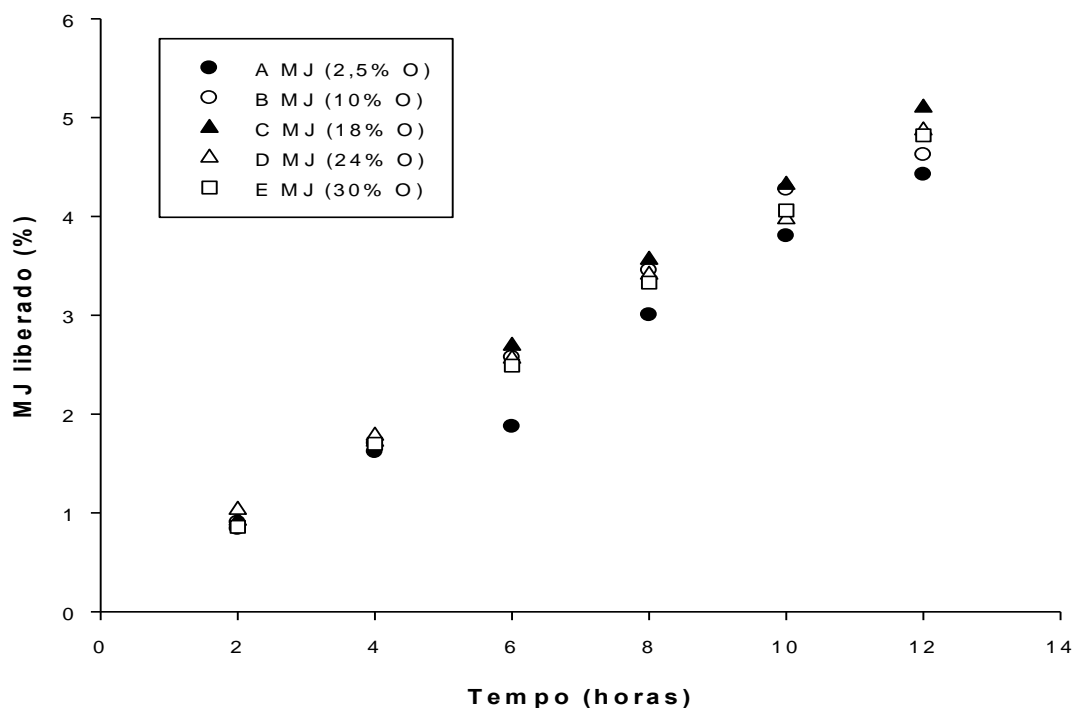


Figura 32. Perfil de liberação do MJ nos sistemas com proporções crescentes de fase oleosa (A: 2,5%, B: 10%, C: 18%, D: 24% e E: 30%) e sistema tensoativo constante (20%).

A liberação do MJ apresentou semelhante perfil em todas as formulações com variação da proporção de fase oleosa. A formulação de menor proporção de fase oleosa liberou MJ em uma quantidade inferior, em torno de 4,4%, quando comparado com a formulação de maior proporção de fase oleosa que liberou em torno de 5,1% de MJ em 12 horas. Não houve diferença significativa entre a liberação e o aumento de fase oleosa, isto significa que o aumento da fase oleosa não alterou o perfil de liberação de MJ a partir das micro e nanoemulsões.

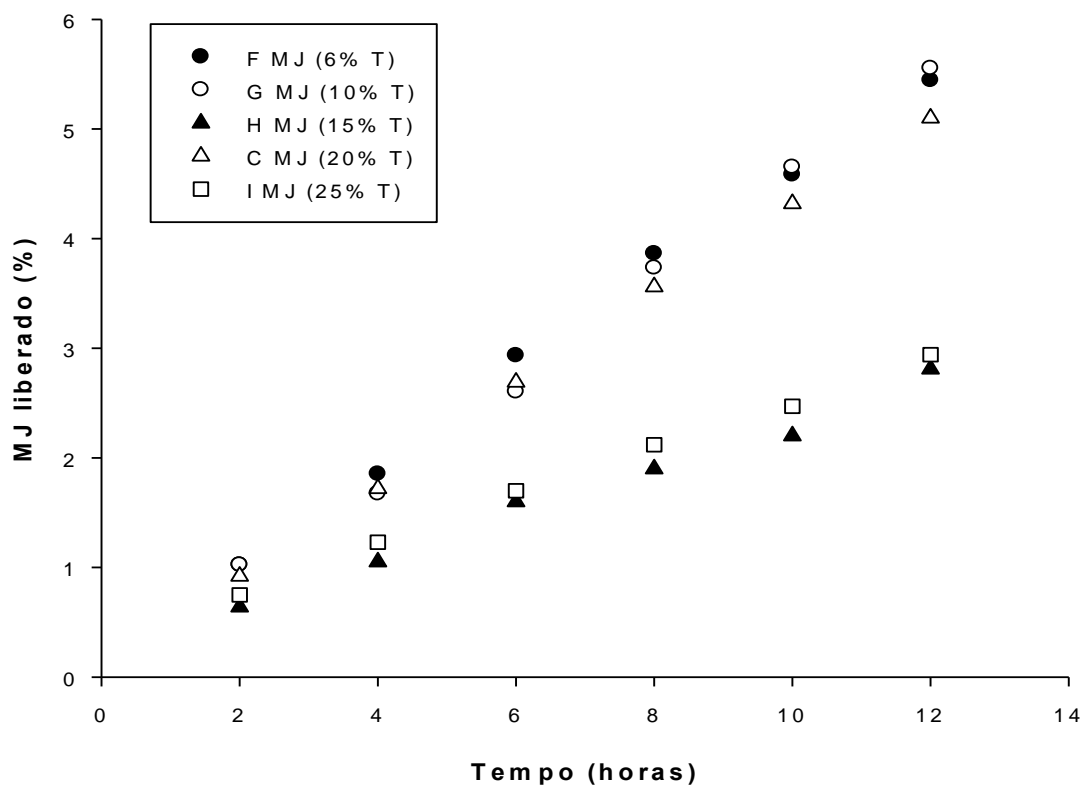


Figura 33. Perfil de liberação do MJ nos sistemas com proporções crescentes de fase tensoativa (F: 6%, G: 10%, H: 15%, C: 20% e I: 25%) e fase oleosa constante (18%).

Na Figura 33 foi possível observar que as formulações de menor proporção de tensoativo apresentaram o mesmo perfil de liberação de MJ enquanto as formulações com maior proporção de tensoativo diminuíram esta liberação. A formulação de menor porcentagem de tensoativo (6%) liberou 5,4% de MJ em 12 horas, enquanto a formulação com maior porcentagem de tensoativo (25%) liberou 2,9% de MJ em 12 horas, o que significa que com o aumento da proporção de tensoativo ocorreu diminuição da velocidade de liberação do MJ, isto ocorre porque o aumento da concentração de tensoativo predomina sobre o efeito da fase oleosa. O tensoativo em alta concentração irá favorecer a permanência do MJ no interior das gotículas sendo assim, com a difusão do fármaco dificultada para o meio externo das micro e nanoemulsões, a liberação será diminuída.

Quando constante K de liberação de cada formulação foi calculada, através do delta de quantidade de fármaco liberado em 12 horas (quantidade de fármaco liberada no maior tempo, 12 horas, subtraída pela quantidade liberada no menor tempo, 2 horas) foram obtidos os seguintes dados mostrados na tabela 16.

Tabela 16. Constante de liberação (K) obtida através de cálculos de delta de concentração em um determinado intervalo de tempo.

Formulações	Fase oleosa(%)	K_{fase oleosa}	Formulações	Tensoativo (%)	K_{tensoativo}
A MJ	2,5	3,59	F MJ	6	4,42
B MJ	10	3,72	G MJ	10	4,53
C MJ	18	4,18	H MJ	15	2,17
D MJ	24	3,84	C MJ	20	4,18
E MJ	30	3,96	I MJ	25	2,19

Esses dados muito próximos de constante com aumento de proporção de fase oleosa ($K_{\text{fase oleosa}}$) confirmam que não houve diferença entre os perfis de liberação destas formulações, tendo em vista que K variou de 3,59 até 4,18. Já os dados de variação de proporção de tensoativo ($K_{\text{tensoativo}}$) mostram uma variação um pouco mais elevada, de 2,17 a 4,53, mostrando uma modificação do perfil de liberação à medida que a proporção de tensoativo foi aumentada.

Ao comparar as Figuras 32 e 33, foi possível perceber que ambas apresentaram baixa cinética de liberação inicial. Com o aumento da proporção da fase oleosa não houve alteração do perfil de liberação de MJ e com aumento da proporção de tensoativo a liberação foi dificultada e, portanto diminuída.

Ao comparar a liberação do controle (Figura 31) com a liberação das micro e nanoemulsões (Figura 32 e 33) fica evidente o efeito destas em retardar a liberação do fármaco. O efeito “burst” inicial presente na curva de liberação do MJ a partir da solução micelar está ausente na liberação a partir das ME e NE, demonstrando fraca interação entre o MJ e a solução micelar. A interação do fármaco lipofílico com a fase interna das ME e NE, permite que o MJ fique retido nas gotículas devido maior estabilidade termodinâmica na fase oleosa (óleo de soja). Já a interação do MJ com o sistema micelar é muito mais fraca, tendo em vista que a micela não apresenta um núcleo oleoso e, portanto o fármaco deve ser liberado com mais facilidade. O processo de liberação a partir das micro e nanoemulsões ocorre em duas etapas, o que explica a forte interação do MJ com fase interna destas formulações (Esquema 1): inicialmente o fármaco se difunde através das gotículas para o meio externo das micro e nanoemulsões e depois o fármaco se difunde através da membrana para atingir o meio receptor. Diferente do que ocorre no controle onde o fármaco na solução micelar tem que vencer apenas uma etapa para chegar ao meio receptor. Devido à forte interação do MJ com a fase interna das formulações estudadas a liberação é menor do que na solução micelar onde a interação do MJ é muito mais fraca.

Assim as microemulsões e nanoemulsões agem como reservatório de fármaco, permitindo uma liberação lenta e proporcionando um efeito prolongado (OLIVEIRA *et al.*, 2004; GRASSI, 2006).

Através da análise estatística, com o teste ANOVA (Tukey), observou-se que no tempo inicial de 2 horas, houve diferença estatisticamente significativa entre o perfil de liberação da solução micelar de MJ em relação a todas as formulações, tanto as com variação de fase oleosa como aquelas com variação de tensoativo ($p < 0,01$), porém não houve diferença estatisticamente significativa entre os perfis de liberação das formulações onde foi variada proporção de fase oleosa (A MJ, B MJ, C MJ, D MJ e E MJ) ou entre as formulações

em que foi variada a proporção de tensoativo (F MJ, G MJ, H MJ, C MJ e I MJ). Já no tempo final de 12 horas, houve diferença estatisticamente significante entre o perfil de liberação da solução micelar de MJ em relação ao perfil de liberação de todas as formulações, seja com variação de proporção de fase oleosa ($p < 0,01$) ou de tensoativo ($p < 0,05$). Novamente não ocorreu diferença estatisticamente significante nos perfis de liberação entre as formulações com variação de fase oleosa (A MJ, B MJ, C MJ, D MJ e E MJ) ou entre as formulações com variação de tensoativo (F MJ, G MJ, H MJ, C MJ e I MJ).

Foram aplicados modelos matemáticos nos perfis de liberação, com o objetivo de descrever o mecanismo de liberação a partir de cada formulação. Um método utilizado para escolher o melhor modelo de liberação de fármacos é o coeficiente de determinação R^2 . O modelo matemático que melhor descreve o perfil de liberação é aquele que apresenta o maior coeficiente de determinação e que se ajuste ao perfil de liberação obtido (COSTA & LOBO, 2001).

O modelo que mais se adequou à liberação das formulações foi o de ordem zero, considerando o intervalo de 2 a 12 horas de liberação. Todas as formulações apresentaram um R^2 alto neste modelo. Com exceção da liberação do controle (solução micelar de MJ), como mostra a tabela 17.

Tabela 17. R² obtido através dos dados da liberação *in vitro* das formulações a partir da equação de ordem zero.

Formulações	R²	Formulações	R²
A MJ	0,982	F MJ	0,996
B MJ	0,988	G MJ	0,995
C MJ	0,998	H MJ	0,989
D MJ	0,997	I MJ	0,997
E MJ	0,999	SM de MJ controle	0,915

A cinética de liberação a partir de micro e nanoemulsões tem sido demonstrada ser de ordem zero ou primeira ordem e ela é influenciada pelas propriedades do fármaco e pela composição das formulações, que irão determinar a sua localização na interface óleo/água e, portanto, a velocidade de liberação do fármaco (BRUXEL *et al.*, 2012). Diversas são as propriedades do fármaco que podem influenciar a sua liberação a partir de uma formulação. Se um fármaco for mais lipofílico, ele estará mais solubilizado na fase oleosa de modo a ser liberado mais lentamente do que um fármaco menos lipofílico. O pk do fármaco juntamente com o pH do meio determinam o grau de ionização, o que influencia a liberação. O coeficiente de partição e o tamanho da molécula também são importantes, quanto maior o peso molecular mais lenta será a velocidade de liberação (BRUXEL *et al.*, 2012).

Uma formulação que assume uma cinética de ordem zero geralmente libera o fármaco lentamente, muito comum em sistemas transdérmicos, sistemas que contém fármacos pouco solúveis, formas revestidas, sistemas osmóticos e outros. A forma farmacêutica que segue este perfil de liberação de zero ordem, isto é, que libera mesma quantidade de fármaco em um

determinado intervalo de tempo, apresenta um método ideal de liberação para realizar um efeito farmacológico prolongado (COSTA & LOBO, 2001).

4.6 Avaliação da atividade antitumoral em TAE

A formulação G (18% O, 10% T e 72 %A) (Tabela 1) foi escolhida como tratamento dos grupos: V, VI e VII devido aos resultados obtidos na caracterização físico-química, como reduzido diâmetro das gotículas após incorporação do fármaco (72,42 nm), baixa polidispersidade, campo escuro na microscopia de luz polarizada indicando sistema isotrópico, baixo índice de consistência (0,09) indicando fluidez da formulação e pela ausência de sistema estruturado verificado através do SAXS. Devido a todas estas características esta formulação foi classificada como microemulsão.

A atividade antitumoral *in vivo* das formulações contendo MJ e dos controles positivo e negativo, foi avaliada usando como modelo animal camundongos Balb/c fêmeas. Após desenvolvimento do tumor e subsequente tratamento de cada grupo, os animais foram sacrificados e os tumores foram removidos, como mostra a figura 34, para medição, pesagem e realização de cortes histológicos para verificar angiogênese e mitose através de microscopia (Figura 35).

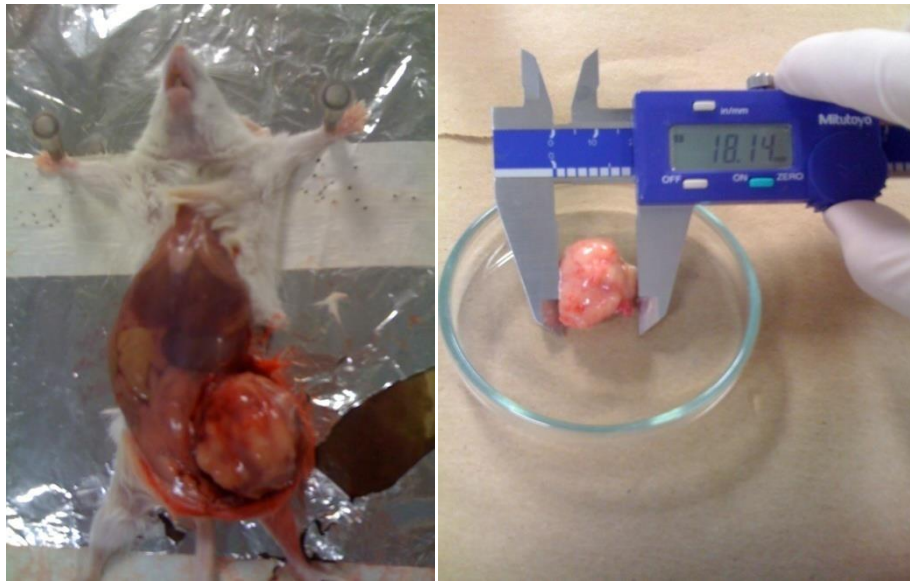


Figura 34. Análise macroscópica do tumor evidenciando a massa tumoral desenvolvida próximo a pata e medição com paquímetro após a retirada do tumor. Animal tratado com o controle negativo (salina).

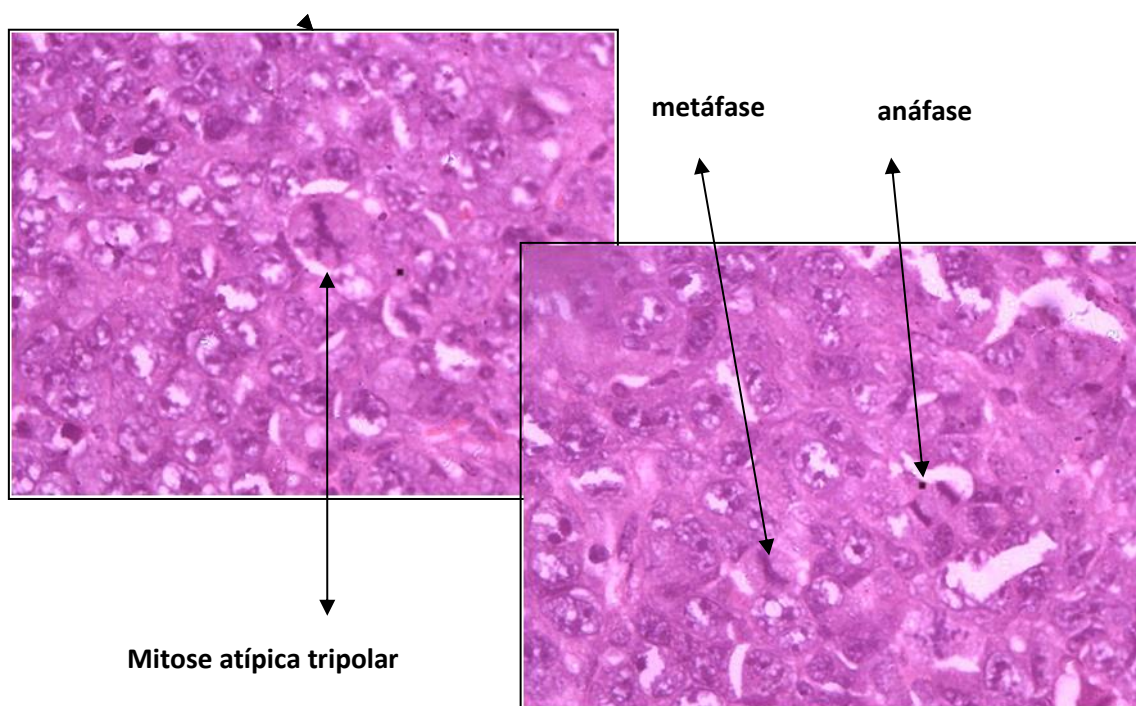


Figura 35. Análise microscópica do tecido tumoral. No qual há presença de mitoses típicas e atípicas. As lâminas histológicas foram coradas com hematoxilina e eosina (H/E) e observadas em microscópio óptico comum sob aumento de 400x.

Na Figura 35 é possível observar a alta frequência de mitoses, principalmente nos cortes tumorais de controles negativos (salina e ME vazia), as quais também ocorreram nos cortes histológicos de controle positivo (doxorrubicina) e nos cortes em que os animais foram tratados com MJ e MJ incorporado a microemulsão (MJ-ME).

A mitose está associada à proliferação celular, sendo sua presença indicativa de que as células tumorais estão em constante divisão celular com consequente aumento da massa tumoral. A mitose está relacionada ao pior prognóstico de acordo com a classificação de MAGS. A Figura 36 ilustra esta classificação onde a maior nota (5) representa campo em que as células apresentaram mitose. A nota 4 representa as aberrações celulares. O campo com nota 3 foi aquele em que as células apresentaram núcleo aumentado e hiper cromático. A nota 2 foi relacionada ao campo em que as células estão aumentadas e com núcleo claro, porém proeminente. O campo com nota 1 está relacionado com células aumentadas, sem alteração no núcleo e a nota 0 foi dada a célula endotelial normal.

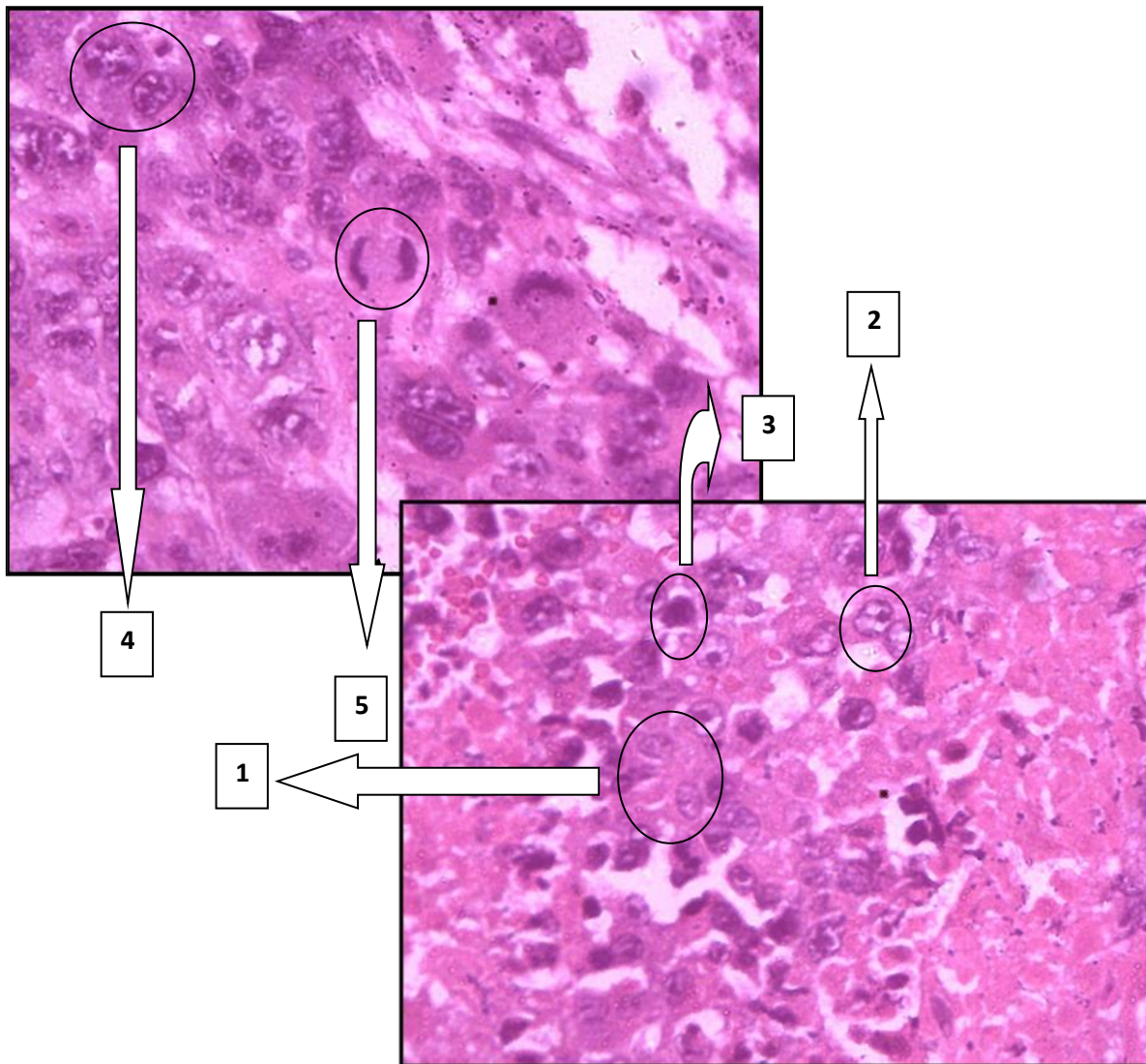


Figura 36. Análise microscópica do tecido tumoral, onde as setas apontam X da classificação MAGS: X possui um valor entre 0 e 5 indicando a aparência histológica das células endoteliais na zona de hiperplasia (0 = célula endotelial normal; 1 = célula aumentada, mas com núcleo normal e claro; 2 = célula aumentada, mas com núcleo claro e proeminente; 3 = célula com núcleo grande e hiper Cromático; 4 = células endoteliais “bizarrras”; 5 = células que apresentem figura mitótica). As lâminas foram coradas com hematoxilina e eosina (H/E) e observadas em microscópio óptico comum sob aumento de 400x.

A Figura 37 mostra a presença de vasos sanguíneos em torno das células tumorais. Esses vasos são indicativos da angiogênese. A angiogênese acontece devido à necessidade nutricional do tecido tumoral para continuar seu desenvolvimento. Para isso é necessária a

angiogênese, como uma via dos nutrientes. Além disso, a angiogênese pode fazer com que o tumor se dissemine, pois pela a via que traz os nutrientes pode disseminar as células tumorais para outros locais.

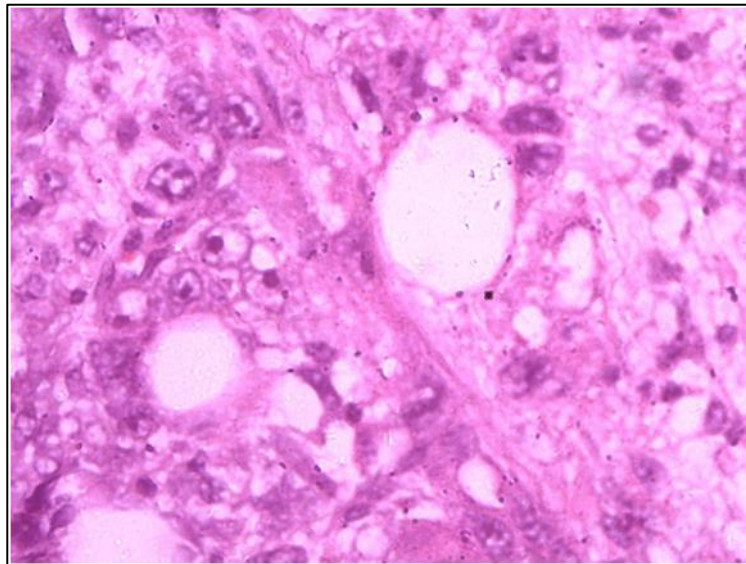


Figura 37. Análise microscópica tumoral onde fica evidente a presença de vasos sanguíneos. As lâminas foram coradas com hematoxilina e eosina (H/E) e observadas em microscópio óptico comum sob aumento de 400x.

Na Figura 38 pode-se observar o resultado da inibição do volume tumoral. Os tumores foram retirados dos camundongos após término do tratamento e tempo adequado de espera de crescimento. Logo após a retirada os tumores foram pesados e medidos para calcular o volume tumoral. Com este cálculo pode-se então calcular a porcentagem de inibição do crescimento tumoral de cada grupo, sendo o grupo tratado com salina equivalente a 0% de inibição, o qual foi usado como base para cálculo da inibição dos outros grupos. O valor foi expresso em média \pm desvio padrão, com $n=5$, já que cada grupo de tratamento foi composto por 5 animais.

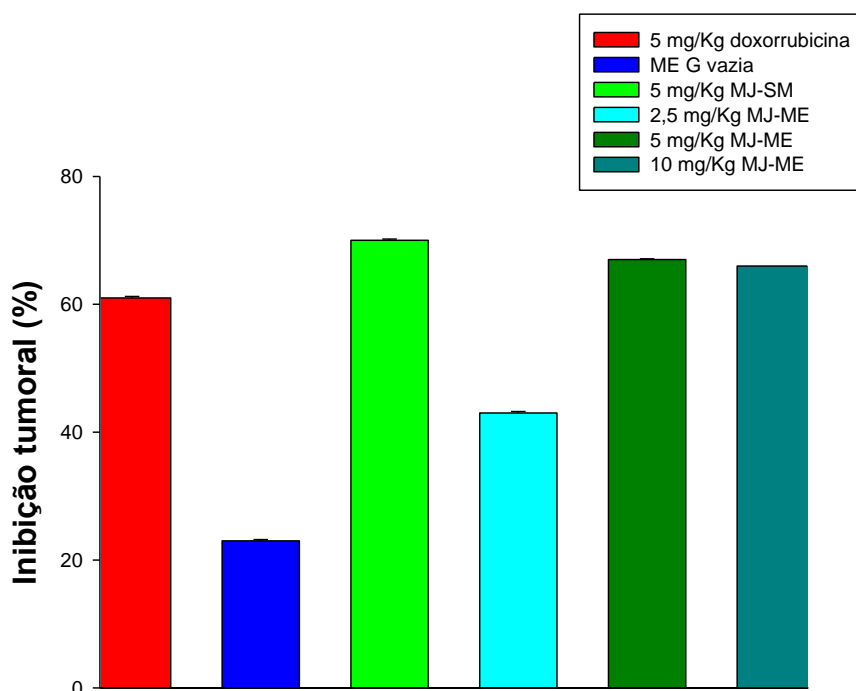


Figura 38. Determinação da inibição do volume tumoral.

Através da Figura 38 e Tabela 18 foi possível observar que a maior porcentagem de inibição tumoral foi da solução micelar de MJ com 70 % de inibição do volume tumoral (IT). A doxorrubicina utilizada como controle positivo apresentou IT de 61% enquanto o grupo de microemulsão vazia utilizado como controle negativo obteve inibição de 23%. Já os grupos de tratamento com MJ incorporado nas microemulsões (2,5; 5,0 e 10,0 mg MJ) apresentaram um IT de 43%, 67% e 66% respectivamente. As inibições do volume tumoral foram em relação ao comportamento do grupo salina, um grupo de controle negativo, utilizado como base para estes cálculos.

Esses resultados mostram que a solução micelar de MJ apresentou inibição do volume tumoral superior ao da doxorrubicina usada como controle positivo. O MJ incorporado nas microemulsões, na menor dose (2,5 mg) não produziu inibição do volume tumoral de mesma

intensidade do controle positivo. Porém nas maiores doses (5,0 e 10,0 mg) a inibição percentual do volume tumoral foi mais intensa do que o controle positivo de doxorrubicina, mantendo-se com intensidades semelhantes em ambas as doses.

A Figura 39 mostra o grau de angiogênese, determinado nos cortes histológicos dos tumores fixados em lâminas e corados com hematoxilina/eosina, através do Sistema de Gradação para Angiogênese por Microscopia (MAGS). Os resultados foram expressos como a média \pm desvio-padrão em valores arbitrários, obtidos de 10 campos aleatórios em cada uma das lâminas de 5 animais de cada grupo de estudo.

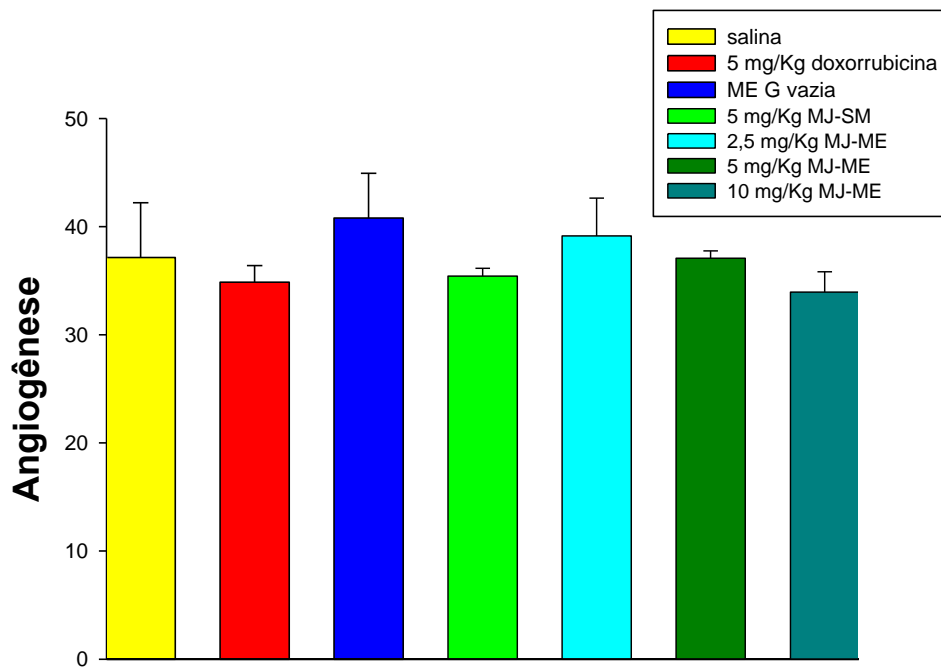


Figura 39. Determinação do grau de angiogênese dos tumores.

Pelos dados da figura 39 e tabela 18 pode-se observar o grau de angiogênese dos diferentes grupos tratados. Os grupos de controle negativo (salina e microemulsão vazia) apresentaram grau de angiogênese de 37,14 e 40,79 respectivamente. Já a doxorrubicina e a solução micelar de MJ apresentaram grau de angiogênese semelhante: 34,86 e 35,42

respectivamente. Os grupos tratados com MJ-ME obtiveram os seguintes graus de angiogênese: 39,14 (2,5 mg/Kg); 37,08 (5 mg/Kg) e 33,94 (10 mg/Kg).

Apesar de os graus de angiogênese terem sido todos relativamente altos e de valores próximos, podem ser apontadas ocorrências significantes: houve uma queda nestes valores quando tratados com o controle positivo (doxorubicina) ou com a solução micelar de MJ em relação aos valores do grau de angiogênese dos controles negativos, o que indica que a DOXO e o MJ inibiram o crescimento de novos vasos sanguíneos diminuindo, ainda que de forma sutil, a forma de nutrição desses tumores. E quando os grupos foram tratados com MJ-ME os valores mantiveram-se altos e semelhantes aos dos controles negativos nas concentrações de 2,5 e 5,0 mg de MJ-ME, mas na concentração de 10 mg MJ-ME o grau de angiogênese foi o menor entre todos os tratamentos, sendo até mesmo um pouco menor que os do controle positivo, o que indica que na mais alta concentração de MJ incorporado à ME, a criação de novos vasos sanguíneos começa a ser inibida de modo a evitar o crescimento tumoral.

A literatura recente explica a associação de terapia anti-angiogênica e antitumorais para tratamentos de câncer (TAKARA *et al.*, 2012, GEORGE & MOORE, 2006). Pesquisas relacionadas com este tipo de associação têm ocorrido, pois alguns tipos de tumores não respondem a determinados antineoplásicos ou não são capazes de conter a angiogênese dos tumores. Portanto essa associação pode ser benéfica e aumentar a possibilidade de sucesso do tratamento.

A doxorubicina utilizada nesta etapa como controle positivo, devido a sua alta eficácia contra tumores, tem sido associada a inibidores angiogênicos, pois sua ação anti-angiogênica ainda é baixa e pouco conhecida.

Poucos são os relatos de metiljasmonato e angiogênese na literatura (ZHENG *et al.*, 2013; PEREIRA LOPES *et al.*, 2010, REISCHER *et al.*, 2007). Ao contrário do que sugere

PEREIRA LOPES *et al.*, 2010 ao afirmar que a ação do metiljasmonato seja relevante sobre a angiogênese, nosso trabalho mostra através da análise da figura 38 que o MJ exerce pouco efeito sobre a angiogênese quando comparado com a salina (controle negativo). Como a ação do metiljasmonato já é conhecida, através de três mecanismos que podem ou não ocorrer simultaneamente: mecanismo bioenergético, mecanismo de re-diferenciação e mecanismo mediador de espécies de oxigênio-reativo (FLESCHER, 2007), sabe-se que nenhum destes está relacionado com a inibição da angiogênese.

A Tabela 18 mostra os parâmetros tumorais de todos os grupos após receberem os diferentes tratamentos e conseqüente retirada dos tumores após sacrifício dos camundongos.

Tabela 18. Parâmetros tumorais após tratamento.

Tratamentos	Massa (g)	Volume (mm ³)	Inibição Tumoral (%)	Angiogênese
Salina	7,0 ± 3,9	6550	0	37,14 ± 5,07
Doxorrubicina (5mg/Kg)	3,3 ± 1,5	2539 *	61	34,86 ± 1,54
ME G vazia	6,1 ± 1,2	5048	23	40,79 ± 4,14
SM de MJ (5mg/Kg)	2,9 ± 2,0	1941 *	70	35,42 ± 0,73
2,5 mg/Kg MJ-ME	4,4 ± 1,5	3720	43	39,14 ± 3,50
5,0 mg/Kg MJ-ME	3,2 ± 2,0	2132 *	67	37,08 ± 0,67
10 mg/Kg MJ-ME	2,7 ± 1,9 *	2214 *	66	33,94 ± 1,89 **

Estatística: * p<0,05 em relação a salina e ** p<0,05 em relação a ME vazia

O volume foi utilizado para calcular a inibição do volume tumoral, por isso os

resultados são equivalentes.

A massa dos tumores também demonstra a relação da progressão tumoral versus tratamentos. Os grupos de controles negativos obtiveram os tumores de maiores massa: 7,0g (salina) e 6,1g (ME vazia). O controle positivo (doxorrubicina) apresentou uma média de peso de 3,3g, mas o grupo da solução micelar de MJ obteve um peso menor ainda de 2,9g, o que indica redução do peso tumoral com o MJ usado como tratamento. Já os grupos de MJ-ME obtiveram redução no peso à medida que a concentração de MJ-ME aumentou, sendo importante ressaltar que o grupo de maior concentração 10 mg MJ-ME obteve a menor média de peso de todos os grupos, o que indica que esta dose de MJ em um sistema de liberação prolongada pode diminuir ou estacionar crescimento tumoral. O mesmo fato ocorreu na angiogênese onde esta concentração 10 mg MJ-ME apresentou o menor grau de angiogênese.

Através da análise estatística, ANOVA (1 critério) e teste de Tukey, foi possível observar que houve diferença estatisticamente significante entre os grupos tratados com salina e os grupos tratados com 10 mg/Kg MJ-ME em relação ao peso tumoral ($p < 0,05$), também houve diferença estatisticamente significante entre os grupos tratados com salina e os grupos tratados com: doxorrubicina, MJ livre, 5 mg/Kg MJ-ME e 10 mg/Kg MJ-ME em relação ao volume tumoral ($p < 0,05$). E em relação ao grau de angiogênese houve diferença estatisticamente significante entre os grupos de ME vazia e os grupos tratados com 10mg/Kg MJ-ME ($p < 0,05$). Todos os outros grupos não citados, não apresentaram diferença estatisticamente significante.

5. CONCLUSÕES

- Foi possível obter microemulsões e nanoemulsões utilizando a metodologia associada ao uso dos tensoativos: sais de ácidos graxos, glicerol e fosfatidilcolina de soja nas seguintes proporções 8:4:1, água ultra pura como fase aquosa e óleo de soja como fase oleosa.
- A organização estrutural destes sistemas é dependente da proporção de mistura dos componentes, assim como da incorporação e da proporção de MJ.
- O raio hidrodinâmico das gotículas diminuiu com aumento da proporção de fase oleosa na ausência e presença de MJ e com aumento da proporção de tensoativo na ausência do fármaco. O raio hidrodinâmico aumentou com aumento da proporção de tensoativo na presença do fármaco e com o aumento da proporção de MJ e incorporação do fármaco.
- As formulações apresentaram transição entre comportamento pseudoplástico, newtoniano, tixotrópico e anti-tixotrópico.
- A maioria das formulações apresentou isotropia.
- Quando MJ foi adicionado às formulações, a maioria destas passou a apresentar estrutura amorfa.
- As curvas de SAXS mostraram que a incorporação do MJ gerou uma desestruturação dos sistemas.
- O potencial zeta das formulações de forma geral apresentou valor alto e negativo. A incorporação do MJ e o aumento de sua proporção gerou uma redução dos valores do potencial zeta, em módulo.

- As ME e NE comportaram-se como sistemas reservatórios *in vitro* retardando a liberação do fármaco quando comparado com a liberação do controle. A velocidade de liberação do MJ foi dependente da proporção de tensoativo.
- A formulação G (18% O, 10% T e 72% A) foi selecionada para ensaio de atividade antineoplásica *in vivo* por apresentar características de microemulsão como isotropia, reduzido raio hidrodinâmico, baixa polidispersidade, baixo índice de consistência e ausência de sistema estruturado, sendo um sistema viável para administração intravenosa.
- A inibição do volume tumoral da solução micelar de MJ superou a do controle positivo, doxorrubicina. À medida que a concentração do MJ-ME foi aumentando a inibição tumoral manteve constante.
- O grau de angiogênese para os grupos tratados com MJ-ME manteve-se alto com pequena dependência da dose.
- A média de peso dos tumores para os grupos tratados com MJ-ME foi reduzindo à medida que a concentração de MJ-ME aumentou.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABOOFAZELI, R. Nanometric scaled emulsions (Nanoemulsions). **Iranian J. Pharm. Res.**, vol. 9, p. 325–326, 2010.

ABOOFAZELI, R.; BARLOW, D.; LAWRENCE, M. J., Particle size analysis of concentrated Phospholipid microemulsions II. Photon correlation spectroscopy. **APPS Pharm. Sci.**, v.2, n.3, E.19, 2000.

ABRAMOWITZ, M.; PARRY-HILL, M. J.; DAVIDSON, M. Polarized light microscopy. The Florida State University and Olympus American Inc. Disponível em: <<http://www.microscope.fsu.edu/primer/java/polarizedlight/filters/index.html>>. Acesso em 30 de outubro de 2013.

ALMEIDA, V. D.; LEITÃO, A.; REINA, L. D. C. B.; MONTANARI, C. A., DONNICI, C. L., LOPES, M. T. P. Câncer e agentes antineoplásicos ciclo-celular específicos e ciclo-celular não específicos que interagem com o DNA: uma introdução. **Quim. Nova**, vol. 28, p. 118-29, 2005.

BEATRIZ, A.; ARAÚJO, Y. J. K.; LIMA, D. P. Glicerol: um breve histórico e aplicação em sínteses estereosseletivas. **Quim. Nova**, vol. 34, p. 306-319, 2011.

BEAUCAGE, G.; ULIBARRI, T. A.; BLACK, E. P.; SCHAEFER, D. W. Hybrid organic inorganic composites, Washington DC, American Chemical Society, Cap. 9, 1995.

BRASIL (2012a) Resolução nº 482, de 23 de setembro de 1999. Disponível em: <www.anvisa.gov.br>. Acesso em 28 de outubro de 2013.

BRASIL (2012b). Portaria do Ministério da Agricultura, Abastecimento e Reforma Agrária, nº 795 de 15 de dezembro de 1993. Disponível em: <www.agricultura.gov.br>. Acesso em 28 de outubro de 2013.

BREM, S.; COTRAN, R.; FOLKMAN, J. Tumor angiogenesis: a quantitative method for histological grading. **J. Natl. Cancer Institute**, vol. 48, p. 347–56, 1972.

BRINON, L.; GEIGER, S.; ALARD, V.; DOUCET, J.; TRANCHANT, J.T.; COUARRAZE, G. Percutaneous absorption of sunscreens from liquid crystalline phases. **J. Control. Rel.**, v. 60, p. 67-76, 1999.

BRUXEL, F.; LAUX, M.; WILD, L. B.; FRAGA, M.; KOESTER, L. S.; TEIXEIRA, H. F. NANOEMULSÕES COMO SISTEMAS DE LIBERAÇÃO PARENTERAL DE FÁRMACOS. **Quim. Nova**, vol. 35, p. 1827-1840, 2012.

CALVO, P.; REMUNAN-LOPEZ, C.; VILA-JATO, J. L.; ALONSO, M. J. Development of positively charged colloidal drug carriers: chitosan-coated polyester nanocapsules and submicron-emulsions. **Colloid Polym. Sci.**, vol. 275, p. 46-53, 1997.

CARVALHO, F.C. Desenvolvimento e caracterização de sistemas nanoestruturados para potencial administração nasal de zidovudina. 2009. 143f. Dissertação (Mestrado em Ciências

Farmacêuticas) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2009.

CHABNER, B. A.; CALABRESI, P. Em *As Bases Farmacológicas da Terapêutica*; Goodman, L. S.; Gilman, A., eds.; Mc Graw Hill: Rio de Janeiro, p. 903-949, 1995.

CHEN, X.; DING, G.; GAO, Q.; SUN, J.; ZHANG, Q.; DU, L.; QIU, Z.; WANG, C.; ZHENG, F.; SUN, B.; NI, J.; FENG, Z.; ZHU, J. A Human Anti-c-Met Fab Fragment Conjugated with Doxorubicin as Targeted Chemotherapy for Hepatocellular Carcinoma. **PLoS ONE** 8(5): e63093. doi:10.1371/journal.pone.0063093, 2013.

COHEN, S. & FLESCHER, E. Methyl jasmonate: A plant stress hormone as an anti-cancer drug. **Phytochemistry**, v. 70, p. 1600-1609, 2009.

CONSTANTINIDES, P. P.; WELZEL, G.; ELLENS, H.; SMITH, P. L.; STURGIS, S.; YIV, S. H.; OWEN, A. B. Water in Oil Microemulsions Containing Medium-Chain Fatty Acid/Salts: Formulation and Intestinal Absorption Enhancement Evaluation. **Pharm. Res.**, v. 13, p. 210-215, 1996.

CONSTANTINIDES, P. P. Lipid Microemulsions for Improving Drug Dissolution and Oral Absorption: Physical and Biopharmaceutical Aspects. **Pharm. Res.**, v. 12, p. 1561-1572, 1995.

CONSTANTINIDES, P. P.; LANCASTER, C. M.; MARCELLO, J.; CHIOSSOME, D. C.; ORNER, D.; HIDALGO, I.; SMITH, P. L.; SARKAHIAN, A. B.; YIV, S. H.; OWEN, A. J.

Enhanced intestinal absorption of an RGD peptide from water-in-oil microemulsions of different composition and particle size. **J. Control. Rel.**, v. 34, p. 109-116, 1995.

CONSTANTINIDES, P. P.; SCARLAT, J. P.; LANCASTER, C.; MARCELLO, J.; MARKS, G.; ELLENS, H.; SMITH, P. L. Formulation and Intestinal Absorption Enhancement Evaluation of Water in Oil Microemulsions Incorporating Medium-Chain Glycerides. **Pharm. Res.**, v. 11, p. 1385-1390, 1994.

COSTA, P. & LOBO, J. M. S. Modeling and comparison of dissolution profiles. **Eur. J. Pharm. Sci.**, v.13, p. 123–133, 2001.

CORREA, M. A.; SCARPA, M. V.; FRANZINI, M. C.; OLIVEIRA, A. G. On the incorporation of the non-steroidal anti-inflammatory naproxen into cationic O/W microemulsions. **Colloids Surf.**, v. 43, p. 108-114, 2005.

DAGLI, M. L. Z. Disseminação Linfática do Tumor de Ehrlich: Estudo Experimental. 1989. 148p. Tese (Doutorado em Patologia Experimental e Comparada) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 1989.

DALMORA, M. E. A.; DALMORA, S. L.; OLIVEIRA, A. G. Inclusion complex of piroxicam with β -cyclodextrin and incorporation in cationic microemulsion. In vitro drug release and in vivo topical anti-inflammatory effect. **Int. J. Pharm.**, v. 222, p. 45-55, 2001.

DALMORA, M. E. A. & OLIVEIRA, A. G. Inclusion complex of piroxicam with β -cyclodextrin and incorporation in hexadecyltrimethylammonium bromide based microemulsion. **Int. J. Pharm.**, v. 184, p. 157-164, 1999.

DAVIES, N. J.; HAYDEN, R. E.; SIMPSON, P. J.; BIRTWISTLE, J.; MAYER, K.; RIDE, J. P.; BUNCE, C. M. AKR1C isoforms represent a novel cellular target for jasmonates alongside their mitochondrial-mediated effects. **Cancer Res.**, vol. 69, p. 4769-4775, 2009.

D'ONOFRIO, C.; AMICI, C.; PUGLIANIELLO, A.; FARAONI, I.; LANZILLI, G.; SANTORO, M. G.; BONMASSAR, E. Comparative anti-viral and anti-proliferative activity of PGA_1 and PGJ_2 against HTLV-I-infected MT-2 cells. **Int. J. Cancer**, v. 51, p. 481-488, 1992.

DORLHIAC-LAACER, P. E.; MARQUEZINI, M. V.; TOFFOLETTO, O.; CARNEIRO, R. C. G.; MARANHÃO, R. C.; CHAMONE, D. A. F. In vitro cytotoxicity of the LDE: daunorubicin complex in acute myelogenous leukemia blast cells. **Br. J. Med. Biol. Res.**, v. 34, p. 1257, 2001.

ELIA, U. & FLESCHER, E. P13K/Akt activation attenuates the cytotoxic effect of methyl jasmonate toward sarcoma cells. **Neoplasia**, v. 10, p. 1303-1313, 2008.

EZEKWUDO, D.; SHASHIDHARAMURTHY, R.; DEVINENI, D.; BOZEMAN, E.; PALANIAPPAN, R.; SELVARAJ, P. Inhibition of expression of anti-apoptotic protein Bcl-2 and induction of cell death in radioresistant human prostate adenocarcinoma cell line (PC-3) by methyl jasmonate. **Cancer Lett.**, v. 270, p. 277-285, 2008.

FAO - Food and Agriculture Organization of the United Nations, 2010. [Online] Disponível em: <<http://www.fao.org/ag/agn/jecfa-flav/details.html?flavId=4619>>. Acesso em 30 de outubro de 2013.

FARMER, E. E. & RYAN, C. A. Interplant communication: air-borne methyl jasmonate induces synthesis of proteinase inhibitors in plant leaves. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v.87, p. 7713-7716, 1990.

FLESCHER, E. Jasmonates in cancer therapy. **Cancer Lett.**, v. 245, p. 1-10, 2007.

FINGRUT, O & FLESCHER, E. Plant stress hormones suppress the proliferation and induce apoptosis in human cancer cells. **Leukemia**, v. 16, p. 608–616, 2002.

FORMARIZ, T. P.; CHIAVACCI, L. A.; SARMENTO, V. H. V; FRANZINI, C. M.; SILVA-JR, A. A.; SCARPA, M. V.; SANTILLI, C. V; EGITO, E. S. T.; OLIVEIRA, A. G. Structural changes of biocompatible neutral microemulsions stabilized by mixed surfactant containing soya phosphatidilcholine and their relationship with doxorubicin release. **Colloids Surf. B.**, v. 63, p. 287-295, 2008.

FORMARIZ, T. P. Formulação e caracterização físico-química e biofarmacêutica de microemulsões lipídicas contendo doxorubicina 203f. Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2008.

FORMARIZ, T. P.; CHIAVACCI, L. A.; SARMENTO, V. H. V; SANTILLI, C. V; EGITO, E. S. T.; OLIVEIRA, A. G. Relationship between structural features and in vitro release of doxorubicin from biocompatible anionic microemulsion. **Colloids Surf. B.**, vol. 60, p. 28-35, 2007.

FORMARIZ, T. P.; SARMENTO, V. H. V; SILVA-JÚNIOR, A. A.; SCARPA, M. V.; SANTILLI, C. V.; OLIVEIRA, A. G. Doxorubicin biocompatible O/W microemulsion stabilized by mixed surfactant containing soya phosphatidylcholine. **Colloids Surf. B.**, v. 51, p. 54-61, 2006.

FORMARIZ, T. P.; URBAN, M. C. C.; SILVA-JÚNIOR; A. A.; GREMIÃO, M. D.; OLIVEIRA, A. G. Microemulsões e fases líquidas cristalinas como sistemas de liberação de fármacos. **Rev. Bras. Ciên. Farmac.**, v. 41, n. 03, p. 301-313, 2005.

FORMARIZ, T. P.; WANCZINSKI, B. J.; JÚNIOR-SILVA, A. A.; SCARPA, M. V.; OLIVEIRA, A. G. Biotecnologia de sistemas coloidais aplicável na otimização do efeito terapêutico de fármacos usados no tratamento do câncer. **Infarma**, v. 16, n.1, p. 44-57, 2004.

FRIBERG, S.E. & BOTHOREL, P. *Microemulsions: Structure and dynamics*; New York: CRC, 1988.

GENNARO, A.R (ed). **Remington**: the science and the practice of pharmacy. 20^aed. Philadelphia: Willians & Wilkins, p.335-343, 2000.

GEORGE, D.J. & MOORE, C. Angiogenesis inhibitors in clinical oncology. **Update Cancer Ther.**, vol. 1, p. 429–434, 2006.

GIBAUD, S.; DEMOY, M.; ANDREUX, J. P.; WEINGARTEN, C.; GOURITIN, B. Cells involved in the capture of nanoparticles in hematopoietic organs. **J. Pharm. Sci.**, v. 85, n. 9, p. 944-950, 1996.

GLATTER, O. *Small-angle-X-rays scattering*. London: Academic Press, 1982.

GOLDIN, N.; HEYFETS, A.; REISCHER, D.; FLESCHER, E. Mitochondria-mediated ATP depletion by anti-cancer agents of the jasmonate family. **J. Bioenerg. Biomembr.**, v. 39, p. 51-57, 2007.

GOMES, N. G. L.; MILANEZ, M. C. (Ed.). *Biologia dos Tumores*. In: Gomes , R.. *Oncologia Básica*. Revinter, Rio de Janeiro, 1997, p.18-35.

GOROSPE, M.; LIU, Y.; XU, Q.; CHERST, F. J.; HOLBROOK, N. J. Inhibition of G₁ cyclin-dependent kinase activity during growth arrest of human breast carcinoma cells by prostaglandin A₂. **Mol. Cell Biol.**, v. 16, p. 762-770, 1996.

GRASSI, M.; GRASSI, G.; LAPASIN, R.; COLOMBO, I. Drug Release from Microemulsions. In: *Understanding Drug Release and Absorption Mechanisms: A Physical and Mathematical Approach*. New York: Taylor & Francis Group, LLC., 2006. cap.8.

GUINIER, A. *Théorie et technique de la radiocristallographie*, Paris: Dunod, 1964. Cap.1.

HEYFETS, A. & FLESCHER, E. Cooperative cytotoxicity of methyl jasmonate with anti-cancer drugs and 2-deoxy-D-glucose. **Cancer Lett.**, v. 250, p. 300-310, 2007.

HUSSEINI, G. A., & PITT, W. G. Micelles and nanoparticles for ultrasonic drug and gene delivery. **Adv. Drug Deliv. Rev.**, v. 60, p. 1137-1152, 2008.

HOLMQVIST, P.; ALEXANDRIDIS, P.; LINDMAN, B. Modification of the Microstructure in Poloxamer Block Copolymer-Water-Oil Systems by Varying the Oil Type. **Macromolecules**, v. 30, p. 6788-6797, 1997.

HYDE, S.T. Identification of lyotropic liquid crystalline mesophases. In: HOLMBERG, K., ed. *Handbook of Applied Surface and Colloid Chemistry*. New York: John Wiley & Sons, 2001. cap. 16, p. 299-332.

ISHII, Y.; KIYOTA, H.; SAKAI, S.; HONMA, Y. Induction of differentiation of human myeloid leukemia cells by jasmonates, plant hormones. **Leukemia**, vol. 18, p. 1413-1419, 2004.

ISLAM, R.; CHYOU, P.; BURMESTER, J. K. Modeling Efficacy of Bevacizumab Treatment for Metastatic Colon Cancer. **J. Cancer**, v. 4, p. 330-335, 2013.

KNIAZHANSKI, T.; JACKMAN, A.; HEYFETS, A.; GONEN, P.; FLESCHER, E.; SHERMAN, L. Methyl jasmonate induces cell death with mixed characteristics of apoptosis and necrosis in cervical cancer cells. **Cancer Lett.**, vol. 271, p. 34–46, 2008.

KILL, Charlene Priscila. Desenvolvimento de nanopartículas de quitosana para potencial administração nasal, DISBe-01 uma desintegrina recombinante do veneno da serpente *Rhinocerophis eithernethus*. 2011. 106f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas)-Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2011.

KIM, J. H.; LEE, S. Y.; OH, S. Y.; HAN, S. I.; PARK, H. G.; YOO, M. A.; KANG, H. S. Methyl jasmonate induces apoptosis through induction of Bax/Bcl-XS and activation of caspase-3 via ROS production in A549 cells, **Oncol. Rep.**, vol. 12, p. 1233–1238, 2004.

KLIPPEL, S.; JAKUBIKOVA, J.; DELMORE, J.; OOI, M.; MCMILLIN, D.; KASTRITIS, E.; LAUBACH, J.; RICHARDSON, P. G.; ANDERSON, K. C.; MITSIADES, C. S. Methyljasmonate displays in vitro and in vivo activity against multiple myeloma cells. **British J. Haematol.**, v. 159, p. 340-351, 2012.

KREILGAARD, M. Influence of microemulsions on cutaneous drug delivery. **Adv. Drug Deliv. Rev.**, v. 54, p. 77-98, 2002.

LAWRENCE, M. J; REES, D. G. Microemulsions-based as novel drug delivery systems. **Adv. Drug Deliv. Rev.**, v. 45, p. 89-121, 2000.

LINDE - The Linde Group, 2013 [Online] Disponível em: <http://hiq.linde-gas.com.br/international/web/lg/br/like35lgspgbr.nsf/docbyalias/anal_gaschrom> Acesso em 30 de setembro de 2013.

MARADUDIN, A. A. & MILLS, D. L. Scattering and absorption of electromagnetic radiation by a semi-infinite medium in the presence of surface roughness. **Phys. Rev. B.**, v. 11, p. 1392-1415, 1975.

MARANHÃO, R. C.; GRAZIANI, S. R.; YAMAGUCHI, N.; MELO, R. F.; LATRILHA, M. C.; RODRIGUES, D. G.; COUTO, R. D.; SCHREIER, S.; BUZAID, A. C. Association of carmustine with a lipid emulsion: in vitro, in vivo and preliminary studies in cancer patients. **Cancer Chemoter. Pharmacol.**, v. 49, p. 487-498, 2002.

MARADUDIN, A. A. & MILLS, D. L. Scattering and absorption of electromagnetic radiation by a semi-infinite medium in the presence of surface roughness. **Phys. Rev. B.**, v. 11, p. 1392-1415, 1975.

MÁTHÉ, C.; SZÉNÁSI, G.; SEBESTÉNY, A.; BLÁZOVICS, A.; SZENTMIHÁLYI, K.; HAMAR, P.; ALBERT, M. Protective effect of CV247 against cisplatin nephrotoxicity in rats. **Hum. Exp. Toxicol.**, DOI: 10.1177/0960327113480972, 2013.

MCCLEMENTS, D. J. Nanoemulsions versus microemulsions: terminology, differences, and similarities. **Soft Matter**, vol. 8, p. 1719-1729, 2012.

MILROT, E.; JACKMAN, A.; KNIAZHANSKI, T.; GONEN, P.; FLESCHER, E.; SHERMAN, L. Methyl jasmonate reduces the survival of cervical cancer cells and downregulates HPV E6 and E7, and surviving. **Cancer Lett.**, v. 319, p. 31–38, 2012.

MILROT, E.; JACKMAN, A.; FLESCHER, E.; KNIAZHANSKI, T.; GONEN, P.; KELSON, I.; KEISARI, Y.; SHERMAN, L. Enhanced killing of cervical cancer cells by combinations of methyl jasmonate with cisplatin, X or alpha radiation. **Invest New Drugs**, v. 31, p. 333-344, 2013.

MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2011. [Online] Disponível em: bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/abc_do_cancer.pdf. Acesso em 21 de setembro de 2013.

MONKS, A.; SCUDIERO, D.; SKEHAN, P.; SHOEMAKER, R.; PAULL, K.; VISTICA, D.; HOSE, C.; LANGLEY, J.; CRONISE, P.; VAIGRO-WOLFF, A.; GRAY-GOODRICH, M.; CAMPBELL, H.; MAYO, J.; BOYD, M. Feasibility of a High-Flux Anticancer Drug Screen Using a Diverse Panel of Cultured Human Tumor Cell Lines. **J. Nat. Cancer Inst.**, v. 83, p. 757-766, 1991.

MUFAMADI, M. S.; CHOONARA, Y. E.; KUMAR, P.; MODI, G.; NAIDOO, D.; VAN VUUREN, S.; NDESENDO, V. M. K.; DU TOIT, L. C.; IYUKE, S. E.; PILLAY V. Ligand-functionalized nanoliposomes for targeted delivery of Galantamine, **Int. J. Pharm.**, v. 448, p. 267– 281, 2013.

NARANG, A. S.; DELMARRE, D.; GAO, D. Stable drug encapsulation in micelles and microemulsions. **Int. J. Pharm.**, v. 345, p. 9-25, 2007.

NEEDLEMAN, P.; TURK, J.; JAKSCHIK, B. A.; MORRISON, A. R.; LEFKOWITH, J. B. Arachidonic acid metabolism. **Ann. Ver. Biochem.**, v. 55, p. 69-102, 1986.

NORLING, T.; LADING, P.; ENGSTRON, S.; LARSSON, K.; KROG, N.; NISSEN, S.S. Formulation of a drug delivery system based on a mixture of monoglycerides and triglycerides for use in the treatment of periodontal disease. **J. Clin. Periodontol.** v. 19, p.687-692, 1992.

NOVAES, M. R. C. G.; BEAL, F. L. R. Farmacologia da L-arginina em pacientes com câncer. **Rev. Bras. Canceriologia**, v.50, n.4, p. 321-325, 2004.

OLIVEIRA, A. G.; CHIAVACCI, L. A.; SCARPA, M. V.; EGITO, E. S. T. Microemulsions: physico-chemical approaches on the system for pharmaceutical applications Chap.II. In: Songjun Li (Ed). (Org.). Current foccus on **Colloids Surf.** Kerala: Research Signpost, p. 1-44, 2009.

OLIVEIRA, A. G.; SCARPA, M. V.; CORREA, M. A.; CERA, L. F. R.; FORMARIZ, T. P. Microemulsões: estrutura e aplicações como sistema de liberação de fármacos. **Quim. Nova**, v. 27, p. 131-138, 2004.

OLIVEIRA, A. G. & SCARPA, M. V. Microemulsões I: fundamentos teóricos da formação do sistema microemulsionado. **Infarma**, v. 1, n. 8, p. 73-79, 2001.

OLIVEIRA, A. G.; SCARPA, M. V.; CHAIMOVICH, H. Effect of hexadecyltrimethylammonium bromide-based microemulsions on the rate of decomposition of the beta-lactam antibiotic cephaclo. **J. Pharm. Sci.**, v. 86, p. 616-620, 1997.

PARK C.; JIN C. Y.; HWANG, H. J.; KIM, G. Y.; JUNG, J. H.; KIM, W. J.; YOO, Y. H.; CHOI, Y. H. J7, a methyl jasmonate derivative, enhances TRAIL-mediated apoptosis through up-regulation of reactive oxygen species generation in human hepatoma HepG2 cells. **Toxicol. In Vitro**, v. 26, p. 86–93, 2012.

PARK, M. K.; LEE, K. M.; HWANG, J. K.; KIM, K. C. Phospholipid-based microemulsions of flubiprofen by the spontaneous emulsification process. **Int. J. Pharm.**, v. 183, p. 145-154, 1999.

PEREIRA LOPES, J. E. F.; BARBOSA, M. R.; STELLA, C. N.; SANTOS, W. A.; PEREIRA, E. M.; NOGUEIRA-NETO, J.; AUGUSTO, E. M.; SILVA, L. V.; SMAILI, S. S.; GOMES, L. F. In vivo anti-angiogenic effects further support the promise of the antineoplastic activity of methyl jasmonate. **Braz. J. Biol.**, v. 70, p. 443-449, 2010.

PESTANA, K. C. *Microemulsões biocompatíveis de anfotericina B para administração oral. Estudo estrutural, liberação in vitro e farmacocinética pré-clínica.* 2009. 109f. Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2009.

PESTANA, K. C.; FORMARIZ, T. P.; FRANZINI, C. M.; SARMENTO, V. H. S.; CHIAVACCI, L. A.; SCARPA, M. V.; EGITO, E. S. T.; OLIVEIRA, A. G. Oil-in-water lecithin-based microemulsions as a potential delivery system for amphotericin. *B. Colloids Surf. B.*, v. 66, p. 253-259, 2008.

QUILLES, M. B. Atividade Anti – Tumoral e Imunomodulatória de Complexos de Paládio (II) Utilizando Modelo Experimental de Ehrlich. 2010. 124f. Dissertação (Mestrado em Análises Clínicas) – Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Araraquara, 2010.

REIS, P. E. D. D.; RODRIGUES, C. C.; VASQUES, C. I.; CARVALHO, E. C. D. Efeitos adversos identificados em local de infusão intravenosa periférica por drogas quimioterápicas. *Cienc. Enferm.*, vol. 14, p. 55-64, 2008.

REISCHER, D.; HEYFETS, A.; SHIMONY, S.; NORDENBERG, J.; KASHMAN, Y.; FLESCHER, E. Effects of natural and novel synthetic jasmonates in experimental metastatic melanoma. *British J. Pharmacol.*, v. 150, p. 739-749, 2007.

RODRIGUES, D. G.; COVOLAN, C. C.; CORADI, S. T.; BARBOZA, R.; MARANHÃO, R. C. Use of a cholesterol-rich emulsion that binds to low-density lipoprotein receptors as a vehicle for paclitaxel. *J. Pharmacy Pharmacol.*, v. 54, p. 765-772, 2002.

ROTEM, R.; HEYFETS, A.; FINGRUT, O.; BLICKSTEIN, D.; SHAKLAI, M.; FLESCHER, E. Jasmonates: Novel Anticancer Agents Acting Directly and Selectively on Human Cancer Cell Mitochondria. *Cancer Res.*, v. 65, p. 1984- 1993, 2005.

ROWE, R. C.; SHESKEY, P. J.; OWEN, S. C. *Handbook of Pharmaceutical Excipients*, 5 ed. London: Pharmaceutical Press, p. 572-579, 2006.

SADECKA, E. & SZELAĞ, H. One-Step Synthesis of W/O and O/W Emulsifiers in the Presence of Surface Active Agents. **J. Surfactants Deterg.**, p. 1-11, 2013.

SANTOS, L. S. A.; BUSS, M. C. M. R. Nanotecnologia: sistema de liberação de fármacos e métodos de caracterização de nanopartículas poliméricas biodegradáveis. [Online] Disponível em: <http://www.unieuro.edu.br/sitenovo/revistas/downloads/farmacia/cenarium_05_16.pdf>. Acesso em 25 de setembro de 2013.

SINGH, A. V., KHARE, M.; GADE, W. N.; ZAMBONI, P. Theranostic Implications of Nanotechnology in Multiple Sclerosis: A Future Perspective, **Autoimmune Dis.**, doi:10.1155/2012/160830, 2012.

SANTOS, F. K. G.; ALVES, J. V. A.; DANTAS, T. N. C.; NETO, A. A. D.; DUTRA J. R. T. V.; NETO, E. L. B. Determinação da concentração micelar crítica de tensoativos obtidos a partir de óleos vegetais para uso na recuperação avançada de petróleo. 4º PDPETRO, Campinas, SP, vol. 72, p. 1-9, 2007.

SCHAFFAZICK, S. R.; GUTERRES, S. S.; FREITAS, L. L.; POHLMANN, A. R. Caracterização e estabilidade físico-química de sistemas poliméricos nanoparticulados para administração de fármacos. **Quim. Nova**, v. 26, n. 5, p. 726- 737, 2003.

SCHRAMM, G. Reologia e reometria: fundamentos teóricos e práticos. São Paulo: Artliber, 2006.

SHANKAR, R.; TIWARY, S. K.; KHANNA, R.; KUMAR, M; KHANNA, A. K. Tumor Angiogenesis: Determined By VEGF Expression, MAGS Scoring, Doppler Study, As Prognostic Indicator In Carcinoma Breast. **The Internet J. Surgery**, 8(1), 2006.

SIGMA ALDRICH-CO, [Online] Disponível em: <www.sigmaaldrich.com>. Acesso em 10 de setembro de 2013.

SILVA, G. B. R. F.; SCARPA, M. V.; ROSSANEZI, G.; EGITO, E. S. T.; OLIVEIRA, A. G. Development and characterization of biocompatible isotropic and anisotropic oil-in-water colloidal dispersions as a new delivery system for methyl dihydrojasmonate antitumor drug. **Int. J. Nanomedicine**, *in press*, 2013.

SILVA, G. B. R. F. Desenvolvimento e análise estrutural de microemulsões lipídicas contendo a substância antitumoral metiljasmonato. Estudos da atividade antiproliferativa *in vitro*, liberação *in vitro* e toxicidade aguda. 2010. 101 f. Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista. “Júlio de Mesquita Filho”. Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Araraquara, 2010.

SILVA, A. E. D.; SERAKIDES, R.; FERREIRA, E.; MORAES, J. R. C.; OCARINO, N. D. M.; CASSALI, G. D. Effect of hypothyroidism on the solid form of the Ehrlich tumor in intact or castrated adult female mice. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, v. 48, 867-874, 2004.

SORENSEN, A. G.; PATEL, S.; HARMATH, C.; BRIDGES, S.; SYNNOTT, J.; SIEVERS, A.; YOON, Y. H.; LEH, E. J.; YANG, M. C.; LEWIS, R. F.; HARRIS, G. J.; LEV, M.; SCHAEFER, P. W.; BUCHBINDER, B. R.; BAREST, G.; YAMADA, K.; PONZO, J.; KWON, H. Y.; GEMMETE, J.; FARKAS, J.; TIEVSKY, A. L.; ZIEGLER, R. B.; SALHUS, M. R.; WEISSKOFF, R. Comparison of diameter and perimeter methods for tumor volume calculation. **J. Clinical Oncol.**, v. 19, p. 551-557, 2001.

SOUZA, A. L. R. Desenvolvimento de nanopartículas lipídicas sólidas contendo praziquantel. 2011, 92 f. Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2011.

TAKARA, K.; HATAKEYAMA, H.; KIBRIA, G.; OHGA, N.; HIDA, K.; HARASHIMA, H. Size-controlled, dual-ligand modified liposomes that target the tumor vasculature show promise for use in drug-resistant cancer therapy. **J. Control. Release**, vol. 162, p. 225–232, 2012.

TAMILVANAN, S. Oil-in-water lipid nanoemulsions: Implications for parenteral and ocular delivering systems. **Prog. Lipid Res.**, vol. 43, p. 489–533, 2004.

TREVIZAN, L. Metabolismo de lipídeos em gatos: Estudo da aceitação de ácidos graxos de cadeia média e dos efeitos da inclusão do ácido γ -linolênico na formação de ácido araquidônico. 2009, 168p. Tese (Doutorado em Zootecnia) Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2009.

TOKUMOTO, M. S. Evolução estrutural durante a transição sol-gel em suspensões coloidais aquosas de SnO₂: abordagem reológica. 1996, 95p. Dissertação (Mestrado em Química) Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 1996.

VILLARÍN, A. J. L. & ARAUJO, L. P. Administración de quimioterapia intravenosa en el paciente oncológico. **Enfermería Clínica**, vol. 13, p. 66-72, 2003.

WARGAFTIG, T. N., Desenvolvimento de Microemulsões Lipídicas Estabilizadas com Fosfatidilcolina de Soja para Veiculação de Vacina de DNA contra Tuberculose. Araraquara, 2000, 90f.. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara, Universidade estadual Paulista, Araraquara, 2000.

WOOD, J. H. Reologia Farmacêutica. In: LACHMAN, L.; LIBERMAN, H.; KANIG, L.J. (Ed). *Teoria e prática na indústria farmacêutica*. 3.ed. Philadelphia: Lea & Febiger, 1986, v. 1, cap. 6, p. 210-253.

YERUVA, L.; ELEGBEDEA, J. A.; CARPER, S. W. Methyl jasmonate decreases membrane fluidity and induces apoptosis via tumor necrosis factor receptor 1 in breast cancer cells. **Anticancer Drugs**, vol. 19, p. 766–776, 2008.

YOUNG, S. & HALLOWES, R. C. (Ed.) *Tumors of the mammary gland*. In: TUROSOV, V.S. Pathology of Tumors in Laboratory animal, part.1, p. 31-51, 1973.

ZHENG, L.; LI, D.; XIANG, X.; TONG, L.; QI, M.; PU, J.; HUANG, K.; TONG, Q. Methyl jasmonate abolishes the migration, invasion and angiogenesis of gastric cancer cells through down-regulation of matrix metalloproteinase 14. **BMC Cancer**, vol. 13, p.74-87, 2013.

ZHOU, J.; MUKHERJEE, P.; GUGGER, E.; TANAKA, T.; BLACKBURN, G. L.; CLINTON, S. K. Inhibition of murino bladder tumorigenesis by soy isoflavones via alterations in cell cycle, apoptosis, and angiogenesis. **Cancer Res.**, vol. 58, p. 5231-5238, 1998.