



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Faculdade de Ciências Farmacêuticas

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

**DESENVOLVIMENTO E ANÁLISE ESTRUTURAL DE
MICROEMULSÕES LIPÍDICAS CONTENDO A SUSBSTÂNCIA
ANTITUMORAL METILJASMONATO. ESTUDOS DA
ATIVIDADE ANTIPROLIFERATIVA *IN VITRO*, LIBERAÇÃO *IN*
VITRO E TOXICIDADE AGUDA.**

Gisela Bevilacqua Rolfsen Ferreira Da Silva

ORIENTADOR: Prof. Dr. Anselmo Gomes De Oliveira

ARARAQUARA – SP

2010



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

**DESENVOLVIMENTO E ANÁLISE ESTRUTURAL DE
MICROEMULSÕES LIPÍDICAS CONTENDO A SUBSTÂNCIA
ANTITUMORAL METILJASMONATO. ESTUDOS DA
ATIVIDADE ANTIPROLIFERATIVA *IN VITRO*, LIBERAÇÃO *IN
VITRO* E TOXICIDADE AGUDA.**

Gisela Bevilacqua Rolfsen Ferreira da Silva

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, Área de Pesquisa e Desenvolvimento de Fármacos e Medicamentos, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, como parte dos requisitos para obtenção do título de mestre em Ciências Farmacêuticas.

ORIENTADOR: Prof. Dr. Anselmo Gomes De Oliveira

ARARAQUARA – SP

2010

Candidata: Gisela Bevilacqua Rolfsen Ferreira da Silva

Título da Dissertação:

Desenvolvimento e análise estrutural de microemulsões lipídicas contendo a substância antitumoral metiljasmonato. Estudos da atividade antiproliferativa *in vitro*, liberação *in vitro* e toxicidade aguda.

A Comissão Julgadora dos trabalhos de defesa da Dissertação de Mestrado, em sessão pública realizada em 20/12/2010, consideraram o(a) candidato(a):

☐ REPROVADO

☒ APROVADO

1) Examinadora *Profa. Dra. Maria Vitória Lopes Badra Bentley*

2) Examinadora *Prof. Dr. Newton Andreo Filho*

3) 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 análise estrutural de microemulsões lipídicas
contendo substância antitumoral metiljasmonato. Estudos da atividade
antiproliferativa *in vitro*, liberação *in vitro* e toxicidade aguda / Gisela
Bevilacqua Rolfsen Ferreira da Silva. – Araraquara, 2010
101 f.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista. “Júlio de
Mesquita Filho”. Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Programa de Pós
Graduação em Ciências Farmacêuticas

Orientador: Anselmo Gomes de Oliveira

. 1. Metiljasmonato. 2. Microemulsão lipídica. 3. Atividade antitumoral. 4.
Liberação prolongada. I. Oliveira, Anselmo Gomes de, orient. II. Título.

CAPES: 40300005

Dedicatória

Dedico esse trabalho a minha filha Gabriela:

Desde a primeira vez que te peguei em meus braços senti que já te conhecia há muito tempo e a partir deste momento passei a entender o sentido da minha vida. Minha vida foi feita pra você e por você.

Agradecimentos

Agradeço ao meu orientador, Prof. Dr. Anselmo Gomes de Oliveira, pelo enorme conhecimento transmitido, pela amizade e por ser em quem me espelho na paixão pela pesquisa e pelo meu trabalho.

Agradeço aos meus pais, Ricardo e Silvia, que acreditaram em meus esforços nunca duvidando da minha capacidade, se esforçaram para que nós pudéssemos ter uma boa educação sempre com muito caráter e carinho. Amo Vocês. Muito Obrigada.

Agradeço aos meus irmãos, Andréia e Rafael, sempre unidos, me proporcionaram uma infância alegre e feliz e hoje são meus melhores amigos.

Agradeço ao meu querido marido, Rangel, por sempre apoiar minhas decisões, me ajudar com os problemas da vida e ser meu companheiro para todas as horas. Te amo.

Agradeço aos meus avós, Silvio, Magaly, Raphael e Olga, muito carinhosos, incentivaram meus estudos, me ensinando que era a coisa mais importante de minha vida.

Agradeço a minha segunda família, Zezito, Luzia, Rafaela e Victor, pela infinita ajuda e carinho e por fazerem com que eu me sinta em casa em suas casas.

Agradeço aos amigos do laboratório Ana Luiza, Andréia, Barbi, Bia, Charlene, Cris, Fer K., Fer C., Flávia, Flávio, Gabi, Giselle, Grazi, Gustavo, Hilris, Márcia, Pri, Vampeta, Luan, Margareth e Fátima, não apenas por me ajudarem inúmeras vezes na parte prática, mas também pelas risadas do dia-dia.

Agradeço aos professores do laboratório Prof^a. Dr^a. Ana Dóris de Castro, Prof^a. Dr^a. Maria Palmira Daflon Gremião, Prof. Dr. Marlus Chorilli e em especial ao amigo Prof. Dr. Raul César Evangelista pela amizade, carinho, correção no inglês e muitas risadas todos os dias no horário do café.

Agradecimentos

Agradeço as secretarias da pós-graduação, Angela, Laura, Sônia, Cláudia e Márcia, pela atenção e ajuda dedicadas durante esses anos.

Ao amigo Alberto Alécio, a querida Kelly e ao Prof. Dr. José Eduardo de Oliveira pela imensurável ajuda e prontidão com o estudo da cromatografia gasosa.

Ao Prof. Dr. Marcos Antonio Corrêa e a Prof^a. Dr^a. Leila Aparecida Chiavacci pelo auxílio e correção no Exame Geral de Qualificação.

Ao Prof. Dr. Celso Santilli e a Prof^a. Dr^a. 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 espalhamento dinâmico de luz e difração de Raios-X.

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

A Prof^a. Dr^a. Vera Lúcia Borges Isaac pela disponibilização do reômetro para as análises reológicas.

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

A CAPES pelo apoio financeiro.

RESUMO

As microemulsões (ME) apresentam grande potencial como sistemas de administração de fármacos, pelas propriedades de solubilizar fármacos hidrofílicos em meio lipofílico ou fármacos lipofílicos em meio aquoso. O objetivo principal desse projeto foi preparar sistemas microemulsionados contendo misturas de Fosfatidilcolina de Soja (FS) / Óleo de Rícino Polioxil-40-Hidrogenado (ORPH) / Oleato de Sódio (OS), Colesterol (CO) e tampão aquoso Tris-HCl pH 7,2 e incorporar a esses sistemas metiljasmonato (MJ), que é inibidor da proliferação *in vitro* e supressor da tumorigenicidade *in vivo*. A caracterização físico-química desses sistemas com e sem MJ foi realizada através das técnicas de espalhamento dinâmico de luz, reologia, microscopia de luz polarizada e difração de raios-x. De acordo com o espalhamento dinâmico de luz foi observada diminuição do raio hidrodinâmico com o aumento da proporção da razão óleo/tensoativos (O/T), tanto na presença como na ausência de MJ. Foi observado aumento do raio hidrodinâmico com o aumento da porcentagem de sistema tensoativo na ausência do fármaco, enquanto na presença de metiljasmonato ocorreu diminuição do raio hidrodinâmico. Independente da variação da proporção de O/T e de sistema tensoativo, ocorreu diminuição do raio hidrodinâmico com a incorporação do fármaco. De acordo com as análises do comportamento reológico todas as amostras apresentaram comportamento de fluido pseudoplástico, porém nas microemulsões isentas de MJ a maioria apresentou tixotropia enquanto na presença do fármaco a maioria apresentou anti-tixotropia. Em relação à microscopia de luz polarizada, na maioria das microemulsões vazias, as fotomicrografias apresentaram “cruzes de malta” indicando sistemas anisotrópicos. Já na presença de fármaco diversas formulações aparentam sistemas isotrópicos (2%, 4% e 10% de fase oleosa e 22% de sistema tensoativo). Em relação à difração de Raios-X todas as amostras apresentaram estruturas amorfas. Foi

realizado o estudo de liberação *in vitro*, as formulações com maior porcentagem de fase oleosa e aquelas com maior porcentagem de sistema tensoativo promoveram uma liberação diminuída de MJ quando comparadas com as formulações de menor porcentagem de colesterol ou sistema tensoativo. Foi estudada a atividade antiproliferativa *in vitro* do MJ na fase interna lipossolúvel da ME onde foram utilizadas nove linhagens de células tumorais humanas. O MJ livre apresentou efeito citostático e citocida para as linhagens de pulmão, apenas citocida para mama resistente, próstata, melanoma e ovário, e apenas efeito citostático para leucemia, cólon, mama e rim. Já com MJ incorporado, a ME exerceu efeito citostático para as linhagens de leucemia e pulmão. A toxicidade aguda (DL₅₀) do MJ e da MJ-ME foi avaliada em camundongos, nas doses de 70, 140, 280 e 350 mg/kg, não tendo ocorrido morte de nenhum animal nas doses administradas. Assim, a agregação de nanotecnologia ao MJ proporcionou um sistema conjugado MJ-ME com dimensões reduzidas, e características inovadoras para uso como estratégia biotecnológica para administração como potente medicamento antitumoral por via endovenosa.

ABSTRACT

Microemulsions (ME) have great potential as drug delivery systems because of their ability to improve the dissolution of drugs in environments with opposite lipophilicity or hydrophilicity. The main objective of this project was to prepare microemulsions systems containing soya phosphatidylcholine (SPC) / polyoxyethyleneglycerol trihydroxystearate 40 (ORPH) / Sodium Oleate (SO) as surfactant, cholesterol (CHO) as oil phase and 0.01M Tris-HCl pH 7.2 as aqueous phase. Methyljasmonate (MJ), an inhibitor of *in vitro* proliferation and *in vivo* suppressor of tumorigenesis, was incorporated into these systems. The physico-chemical characterization of the systems, containing or not MJ, was performed by light scattering, rheological behavior, polarized light microscopy, and X-ray diffraction. According to dynamic light scattering, a decrease in the hydrodynamic radius was observed with increasing proportion of oil phase/surfactant (O/S) in the presence and absence of MJ. In the absence of the drug, the hydrodynamic radius increased with increasing ratio of surfactant, while in the presence of MJ the hydrodynamic radius decreased. The hydrodynamic radius decreased with the incorporation of the drug regardless of the variation in the O/S proportion and surfactant system. According to the rheological analyses, all samples showed pseudoplastic behavior, the microemulsions without drug showed thixotropy behavior, while in the presence of the drug the majority of the samples showed anti-thixotropy behavior. In relation to polarized light microscopy, most of the microemulsions without drug presented "Maltese crosses", indicating anisotropic systems. In the presence of the drug, several formulations seems to be isotropic systems (2%, 4% and 10% of the oil phase and 22% of surfactant system). Regarding the X-Ray diffraction, all samples showed amorphous structures. In the *in vitro* release test, the formulations with higher oil phase ratio (surfactant concentration kept constant) and

Abstract

those with the highest percentage of surfactant system (oil phase concentration constant) promoted a decreased MJ release rate in comparison with those formulations with lower cholesterol or surfactant concentration. The *in vitro* antiproliferative activity was studied, using soluble MJ as internal phase of ME. This study used nine human tumor cell lines. Free MJ presented cytostatic and cytotoxic effects for lung cancer cell line, while only cytotoxic effect was observed for resistant breast, prostate, melanoma and ovarian cancer cell lines, and only a cytostatic effect for leukemia, colon, breast and kidney cell lines. ME containing MJ presented cytostatic effect for leukemia and lung cell lines. The acute toxicity (DL₅₀) of MJ and MJ-ME was evaluated and there were no mice deaths after administration of doses of 70, 140, 280 and 350 mg/kg. Thus, the aggregation of nanotechnology to MJ provides a conjugated MJ-ME with reduced dimensions and innovative characteristic to use in the biotechnological strategy for the administration as a potent antitumor medicine by intravenous via.

ABREVIATURAS

A/O - Água em óleo

A - Fase Aquosa

ATC - Ácido Tricloroacético

CG-EM - Cromatografia gasosa acoplada à espectometria de massas.

CO - Colesterol

CPQBA - Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas

DI - Densidade de Inoculação

DMSO - Dimetilsulfóxido de Sódio

EMG - Emulsão Gel

EML - Emulsão Líquida

EHL - Equilíbrio Hidrófilo Lipófilo

FS - Fosfatidilcolina de soja

HT-29 - Linhagem celular do cólon

IC - Inibição do Crescimento

K562 - Linhagem celular de leucemia

LDL - Lipoproteína de baixa densidade

MACT - Média de absorbância da célula tratada

MCF-7 - Linhagem celular de mama

MJ - Metiljasmonato

MJ-ME - Metiljasmonato incorporado à microemulsão

ME – Microemulsão ou microemulsões

MEG - Microemulsão Gel

MEL - Microemulsão Líquida

Abreviaturas

NCI-ADR - Linhagem celular de mama resistente

NCI-460 - Linhagem celular de pulmão

O - Fase Oleosa

OVCAR-03 - Linhagem celular do ovário

O/A - Óleo em água

ORPH - Óleo de Rícino Polioxil-40-Hidrogenado

OS - Oleato de sódio

PC-03 - Linhagem celular de próstata

SFB - Soro Fetal Bovino

SRB - Sulfarrodamina B

SF - Separação de fases

T - Sistema tensoativo

T0 - Controle da célula tratada no dia da adição das amostras

UACC-62 - Linhagem celular do melanoma

786-0 - Linhagem celular do rim

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Estrutura química da fosfatidilcolina, onde R1 e R2 são ácidos graxos variáveis.....	8
Figura 2: Estrutura química do oleato de sódio.....	9
Figura 3: Estrutura química do colesterol.....	10
Figura 4: Estrutura química dos derivados do jasmonato de ocorrência natural, metiljasmonato e ácido jasmônico.....	15
Figura 5: Esquema de célula de difusão adaptada ao dissolutor.....	29
Figura 6: Linhagens celulares do CPQBA/UNICAMP.....	30
Figura 7: Diagrama de fases pseudoternário de sistemas contendo FS/ORPH/OS (T), Colesterol (O) e Tampão Tris-HCl (A). Legenda: Microemulsão (MEL), Microemulsão Gel (MEG), Emulsão líquida (EML), Emulsão Gel (EMG) e Separação de fases (SF). Pontos em vermelho representam os sistemas caracterizados físico-quimicamente.....	40
Figura 8: Diagrama de fases pseudoternário de sistemas contendo Metiljasmonato, FS/ORPH/OS (T), Colesterol (O) e Tampão Tris-HCl (A). Legenda: Microemulsão (MEL), Emulsão líquida (EML), Emulsão Gel (EMG) e Separação de fases (SF). Pontos em vermelho representam os sistemas caracterizados físico-quimicamente.....	41
Figura 9: Variação do raio hidrodinâmico em função da razão O/T na ausência de metiljasmonato.....	47
Figura 10: Variação do raio hidrodinâmico em função da razão O/T na presença de metiljasmonato.....	48
Figura 11: Variação do raio hidrodinâmico em função da porcentagem de tensoativo na ausência de metiljasmonato.....	49

Figura 12: Variação do raio hidrodinâmico em função da porcentagem de tensoativo na presença de metiljasmonato.....	50
Figura 13: Perfil reológico das microemulsões vazias em função da proporção de fase oleosa.	54
Figura 14: Perfil reológico das microemulsões em função da proporção de fase oleosa, na presença de metiljasmonato.....	55
Figura 15: Perfil reológico das microemulsões vazias em função da proporção de sistema tensoativo.	57
Figura 16: Perfil reológico das microemulsões em função da proporção de sistema tensoativo, na presença de metiljasmonato.....	58
Figura 17: Fotomicrografia dos sistemas preparados com proporções crescentes de fase oleosa (A: 2%, B: 4%, C: 6%, D: 8% e E: 10%) e tensoativo constante (20%) na ausência de metiljasmonato.....	62
Figura 18: Fotomicrografia dos sistemas preparados com proporções crescentes de tensoativo (F: 16%, G: 18%, C: 20%, D: 22% e E: 24%) e fase oleosa constante (6%) na ausência de metiljasmonato.....	63
Figura 19: Fotomicrografia dos sistemas preparados com proporções crescentes de fase oleosa (A: 2%, B: 4%, C: 6%, D: 8% e E: 10%) e tensoativo constante (20%) na presença de metiljasmonato.....	64
Figura 20: Fotomicrografia dos sistemas preparados com proporções crescentes de tensoativo (F: 16%, G: 18%, C: 20%, D: 22% e E: 24%) e fase oleosa constante (6%) na presença de metiljasmonato.....	65
Figura 21: Difratogramas dos componentes: Óleo de Rícino Polioxil-40-Hidrogenado, Fosfatidilcolina de soja, Oleato de Sódio e Colesterol.....	67

Figura 22: Evolução dos difratogramas dos sistemas preparados com proporções crescentes de fase oleosa (A: 2%, B: 4%, C: 6%, D: 8% e E: 10%) e tensoativo constante (20%) na ausência e presença de metiljasmonato.....	68
Figura 23: Evolução dos difratogramas dos sistemas preparados com proporções crescentes de tensoativo (F: 16%, G: 18%, C: 20%, D: 22% e E: 24%) e fase oleosa constante (6%) na ausência e presença de metiljasmonato.....	69
Figura 24: Evolução dos difratogramas da microemulsão A contendo 6% e 20% de MJ.....	70
Figura 25: Cromatograma MJ 500ppm em tampão Tris-HCl acrescido de laurilsulfato de sódio a 0,15% e fragmentograma referente ao pico do MJ.....	71
Figura 26: Curva analítica do MJ em tampão Tris-HCl acrescido de laurilsulfato de sódio a 0,15%, obtida por CG-EM.....	72
Figura 27: Perfil de Liberação <i>in vitro</i> do MJ livre (em solução tampão Tris-HCl acrescido de 0,15% de laurilsulfato de sódio).....	76
Figura 28: Perfil de liberação do MJ nos sistemas com proporções crescentes de fase oleosa: A: 2%, B: 4%, C: 6% e D: 8% e sistema tensoativo constante (20%).....	77
Figura 29: Perfil de liberação do MJ nos sistemas com proporções crescentes de sistema tensoativo: F: 16%, G: 18%, C: 20% e H: 22% e fase oleosa constante (6%)...	78
Figura 30: Atividade antiproliferativa do Cloridrato de Doxorrubicina (Adriblastina [®] RD, Pharmacia), utilizado como controle positivo (n=3).....	80
Figura 31: Atividade antiproliferativa da Microemulsão vazia estabilizada com 20% de FS/ORPH/OS, contendo 2% de CO como fase oleosa e 78% de fase aquosa, utilizado como branco do sistema (n=3).....	81
Figura 32: Atividade antiproliferativa do Metiljasmonato livre (n=3).....	82

Figura 33: Atividade antiproliferativa da microemulsão estabilizada com 20% de FS/ORPH/OS, contendo 2% de colesterol como fase oleosa, 78% de fase aquosa e 200 mg/g MJ (n=3).....	83
---	----

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Linhagens celulares utilizadas nos ensaios antiproliferativos.....	31
Tabela 2: Concentrações celulares utilizadas na realização da curva de crescimento celular e densidade de inoculação (DI).....	34
Tabela 3: Composição das formulações selecionadas para a sequência do trabalho.....	44
Tabela 4: Raio Hidrodinâmico.....	46
Tabela 5: Comportamento de fluxo (n) e índice de consistência (K) para as formulações preparadas com proporções fixas de tensoativo e crescentes de fase oleosa e com proporções fixas de fase oleosa e crescentes de tensoativo, na presença e ausência de MJ.....	60
Tabela 6: Precisão intra-corrida e inter-corrida do método analítico do metiljasmonato em tampão.....	73
Tabela 7: Mortalidade dos camundongos Swiss que receberam metiljasmonato.....	84
Tabela 8: Mortalidade dos camundongos Swiss que receberam as microemulsões contendo metiljasmonato.....	85

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	1
2. OBJETIVOS.....	18
2.1. Objetivo geral.....	18
2.2. Objetivo específico.....	18
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	19
3.1. Materiais.....	19
3.1.2. Matérias-Primas, Reagentes e Solventes.....	19
3.1.3. Equipamentos.....	20
3.2. Métodos.....	21
3.2.1. Preparação dos sistemas estabilizados por fosfatidilcolina de soja, oleato de sódio e óleo de rícino.....	21
3.2.2. Diagrama de fase para o sistema estabilizado por FS/ORPH/OS na ausência e presença de 6% (m/v) de MJ.....	22
3.2.3. Caracterização físico-química dos sistemas selecionados.....	23
Determinação do Raio Hidrodinâmico das Gotículas por Espalhamento dinâmico de luz.....	23
Análise Reológica.....	23
Microscopia de Luz Polarizada.....	24
Difração de Raios-X.....	25
3.2.4. Determinação do MJ em formulações por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa.....	25
Sistema Cromatográfico a Gás acoplado a Espectrometria de Massas.....	25
Curva analítica MJ em tampão.....	25
3.2.5. Validação do método analítico.....	26

3.2.6. Incorporação do MJ nos sistemas microemulsionados.....	27
3.2.7. Ensaio de Liberação <i>in vitro</i>	27
3.2.8. Avaliação da atividade antiproliferativa <i>in vitro</i>	29
3.2.9. Avaliação da toxicidade aguda.....	37
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	40
4.1. Diagrama de fases para o sistema estabilizado por FS/ORPH/OS.....	40
4.2. Caracterização físico-química dos sistemas selecionados.....	43
Determinação do Raio Hidrodinâmico por Espalhamento de luz.....	44
Análise Reológica.....	51
Microscopia de Luz Polarizada.....	60
Difração de Raios-X.....	66
4.3. Determinação do MJ em formulações por cromatografia gasosa acoplada à espectometria de massas.....	70
Sistema Cromatográfico.....	70
Curva Analítica do MJ em tampão.....	71
4.4. Validação do método analítico.....	72
4.5. Incorporação do MJ nos sistemas microemulsionados.....	74
Escolha dos sistemas a serem estudados na incorporação e liberação <i>in vitro</i>	74
Incorporação.....	74
4.6. Ensaio de liberação <i>in vitro</i>	74
4.7. Avaliação da atividade antiproliferativa <i>in vitro</i>	79
Escolha do sistema a ser estudado na avaliação <i>in vitro</i>	79
Atividade antiproliferativa da microemulsão contendo MJ.....	79
4.8. Avaliação da Toxicidade Aguda.....	84

5. CONCLUSÕES.....	86
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	88

1. INTRODUÇÃO

1.1. Microemulsões

A nanotecnologia de sistemas de liberação controlada de fármacos surgiu no início da década de 80, com um método comercialmente atrativo para administração de fármacos e obtenção da ação prolongada. Sistemas nanoestruturados são aplicáveis no controle da liberação de fármacos, modulando a velocidade com que estes atravessam as barreiras biológicas, penetram a circulação e atingem o alvo farmacológico. Além disso, os sistemas de vetorização de fármacos podem permitir 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 e SCARPA, 2001; OLIVEIRA *et al.*, 2004).

A biodisponibilidade de um fármaco pode ser modificada pelo uso de vetores medicamentosos e partículas poliméricas. Estes nanocarreadores coloidais proporcionam a liberação do fármaco no sítio de ação desejado (célula, tecido ou órgão), minimizando os efeitos colaterais que normalmente acompanham os medicamentos convencionais. A diminuição dos efeitos tóxicos dos quimioterápicos nos tecidos normais e o aumento da sua eficácia contra diversas doenças têm sido obtido através do uso desses vetores nanoestruturados nos tratamentos com antineoplásicos (GIBAUD *et al.*, 1996; RODRIGUES *et al.*, 2002, FORMARIZ *et al.*, 2006; 2007).

As formas farmacêuticas antitumorais convencionais são geralmente fármacos solúveis ou pouco solúveis em água formulados na forma de pó liofilizado. Entretanto, essa formulação apresenta baixa estabilidade, inespecificidade e, portanto reduzida eficácia terapêutica. Assim, o desenvolvimento de novos sistemas de liberação de fármacos antitumorais para administração endovenosa tem sido um dos principais temas

de pesquisa em tecnologia farmacêutica nos últimos anos. Entre as alternativas avaliadas, destacam-se principalmente as microemulsões (FORMARIZ *et al.*, 2008).

As microemulsões (MEs) têm sido utilizadas com sucesso como veículos de grande variedade de fármacos e substâncias biologicamente ativas como, por exemplo, anti-inflamatórios não esteroidais, vacinas de DNA, antineoplásicos e analgésicos (CORREA, 1996; WARGAFTIGI, 2000; DALMORA *et al.*, 2001; MARANHÃO *et al.*, 2002, FORMARIZ *et al.*, 2006; 2007). Resultados bastante promissores foram obtidos com fármacos antineoplásicos (paclitaxel, carmustina, metrotexato, daunorrubicina e doxorubicina), quando veiculados em sistemas microemulsionados (DORLHIAC-LAACER *et al.*, 2001; RODRIGUES *et al.*, 2002; MARANHÃO *et al.*, 2002, FORMARIZ *et al.*, 2007).

Em 1943, Hoar e Schulman descreveram pela primeira vez o termo microemulsão, como sistemas transparentes ou translúcidos, obtidos por titulação a partir de uma emulsão comum, sendo esta de aspecto leitoso, e quando adicionado álcool de cadeia média este sistema clarifica (GARTI e ASERIN, 1996).

As microemulsões são sistemas termodinamicamente estáveis, isotrópicos, transparentes, de dois líquidos imiscíveis, usualmente água e óleo, estabilizados por um filme de compostos tensoativos, localizados na interface óleo/água (FRIBERG e BOTHOREL, 1988; CONSTANTINIDES *et al.*, 1994; 1995; 1996; OLIVEIRA *et al.*, 1997; DALMORA e OLIVEIRA, 1999; LAWRENCE e REES, 2000; DALMORA *et al.*, 2001; CORREA *et al.*, 2005; FORMARIZ *et al.*, 2006; 2008; 2010). A formação da microemulsão geralmente envolve a combinação de três a cinco componentes, tais como tensoativo, água, óleo e quando necessário, o co-tensoativo (OLIVEIRA *et al.*, 1997; DALMORA e OLIVEIRA, 1999; LAWRENCE e REES, 2000), sendo que a orientação para sistemas O/A ou A/O é dependente das propriedades físico-químicas do tensoativo,

principalmente do seu Equilíbrio Hidrófilo-Lipófilo (EHL) e da relação entre as proporções de tensoativo/co-tensoativo (CONSTANTINIDES *et al.*, 1994; OLIVEIRA *et al.*, 2004; 2009).

Deve haver escolha adequada dos componentes e de suas concentrações que irão compor uma microemulsão, pois isto irá influenciar a orientação desses sistemas. A organização desses sistemas poderá ser formada por gotículas óleo em água, gotículas água em óleo, misturas randômicas bicontínuas (SIROTTI *et al.*, 2002). Em sistemas ricos em tensoativos observam-se estruturas lamelares, enquanto sistemas de estruturas mais rígidas e viscosas geralmente apresentam mesofase com fase hexagonal ou fase lamelar (GARTI e ASERIN, 1996; LAWRENCE e REES, 2000).

A principal característica das microemulsões é formar uma estrutura interna com dimensões reduzidas por homogeneização suave com fase aquosa, cujas gotículas da fase interna são da ordem de nanômetros. As microemulsões 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. Sua estabilidade termodinâmica oferece vantagens sobre as dispersões instáveis, tais como as suspensões e emulsões, possuindo tempo de vida útil muito mais amplo (CONSTANTINIDES, 1995; OLIVEIRA *et al.*, 1997; FORMARIZ *et al.*, 2005; 2006).

As microemulsões podem constituir um importante veículo para formulações farmacêuticas. São sistemas reservatórios, pois permitem uma liberação lenta do fármaco gerando um efeito prolongado (DALMORA *et al.*, 2001). Essas estruturas têm sido investigadas como um sistema de vetorização do fármaco e são usadas para dissolver fármacos lipofílicos em meio aquoso ou fármacos hidrofílicos em meio lipofílico (CORREA *et al.*, 2005 e FORMARIZ *et al.*, 2006).

As microemulsões são frequentemente utilizadas para administração de fármacos lipofílicos solubilizados na fase oleosa de uma microemulsão O/A (OLIVEIRA *et al.*, 2009). Esse tipo de microemulsão apresenta vantagens como sistema de liberação de fármacos já que esse sistema melhora a solubilização de fármacos lipofílicos e permite a administração parenteral deste tipo de fármaco (PARK e KIM, 1999). Quando se trata de aplicação parenteral o diâmetro das gotículas não deve exceder 1µm, pois diâmetros maiores podem ocasionar embolia (TROTITA, 1999). Quando são biocompatíveis e apresentam estabilidade termodinâmica, a microemulsão com fase interna de diâmetro na ordem de submicrons pode ser usada para administração intravenosa (FORMARIZ *et al.*, 2006, 2008 e PESTANA *et al.*, 2008).

Uma possível e simplificada teoria termodinâmica é aceita para explicar a formação e estabilização das microemulsões através do uso do tensoativo: quando dois líquidos imiscíveis são misturados, uma fase interna ou dispersa é cercada por uma fase externa ou dispersante. Nesse processo de dispersão, a formação de pequenas gotículas leva ao aumento da área interfacial e então, ocorre grande aumento de energia livre de superfície. Isto requer grande diminuição da tensão interfacial para estabilizar o sistema termodinamicamente. A estabilidade é dada pela equação (OLIVEIRA *et al.*, 2009):

$$\Delta G = \gamma_i \cdot \Delta S$$

onde: ΔG representa o aumento de energia livre, γ_i representa a tensão interfacial e ΔS representa o aumento da área interfacial. A diminuição da tensão interfacial e consequentemente a estabilidade adquirida por esse sistema se dá pelo uso de tensoativos. Porém muitas vezes os tensoativos não têm a capacidade de diminuir a tensão interfacial compensando toda a energia livre de superfície e então existe a necessidade do uso de co-tensoativos, que diminuem a tensão interfacial suficiente para o sistema ganhar estabilidade termodinâmica (OLIVEIRA *et al.* 2004).

1.2. Diagrama de fases

Diferentes combinações dos componentes do sistema podem gerar diferentes tipos de agregados como: microemulsões, emulsões, cristais líquidos ou até mesmo separação de fases. Para verificar os diferentes tipos de agregados moleculares utiliza-se o diagrama ternário de fases, 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. Geralmente, principalmente em aplicações farmacêuticas, são utilizados outros componentes como: co-tensoativos e/ou fármacos. 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).

1.3. Cromatografia Gasosa acoplada à espectrometria de massas

A espectrometria de massas é a técnica analítica instrumental mais completa que existe na atualidade. Entre suas utilidades pode-se destacar: capacidade de identificação, identificando qualitativamente diferentes tipos de substâncias, utilizando o tipo de ionização adequado; possibilidade de realizar análises quantitativas; capacidade de análise de misturas complexas sempre com alta sensibilidade e especificidade. Na espectrometria de massas a amostra deve ser volatilizada e ionizada e esses íons são subsequentemente separados, ou filtrados, de acordo com a sua razão massa/carga (m/z) e são então detectados (HE, 2000).

Como cada produto apresenta uma massa molecular característica, a análise de todos esses compostos utilizando a espectrometria de massas como detector pode ser considerada como uma técnica universal de detecção.

Até o momento, o espectrômetro de massas é o método mais sensível de análise molecular. Além do mais, tem potencial para fornecer informações não só da estrutura do analito, mas também da sua massa molecular. Ainda, próprio de sua eficácia na capacidade de separação de massas, pode-se obter uma ótima seletividade. Este é o principal fator envolvido na análise de traços (WOLFENDER *et al.*, 1994).

As análises cromatográficas são usadas para guiar o isolamento em escala preparativa de produtos naturais, através da otimização das condições experimentais e checagem, durante todo o processo de separação, da pureza das diferentes frações obtidas, e também controlar a pureza final dos compostos isolados (WOLFENDER *et al.*, 1994).

As substâncias passíveis de análise por cromatografia gasosa precisam preencher, basicamente, dois requisitos: serem voláteis na temperatura utilizada para realizar a separação cromatográfica e serem termicamente estáveis.

A cromatografia gasosa é uma técnica de separação bastante eficiente, conseguindo separar misturas com centenas de componentes. No entanto, uma vez separados, detectados e quantificados todos os componentes individuais, o único dado disponível para a identificação de tais substâncias é o tempo de retenção dos correspondentes picos cromatográficos. Muitas vezes esse dado não é suficiente para uma identificação inequívoca.

Para compostos voláteis, como os óleos essenciais, o espectrômetro de massas é utilizado em combinação com a cromatografia gasosa, surgindo, assim, a cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG-EM). De fato, a CG-EM tem sido

essencial na aplicação nesse campo, sendo que a espectrometria de massas é utilizada rotineiramente como um detector ideal para a cromatografia gasosa.

O acoplamento dessas duas técnicas é bastante compatível, uma vez que ambas trabalham com a amostra em fase gasosa e requerem pequenas quantidades de amostras na análise. O único obstáculo reside no fato de que o efluente que sai da coluna cromatográfica (o gás de arraste, normalmente com um fluxo entre 1-3 mL/min) está a pressão atmosférica e deve ser conduzido até o interior do espectrômetro de massas, que trabalha em alto vácuo. Esse fluxo é tolerado pelo espectrômetro de massas, cujo sistema de bombeamento consegue manter um vácuo adequado, eliminando o excesso desse gás.

1.4. Componentes das microemulsões estudadas

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 microemulsões (OLIVEIRA *et al.*, 2009).

1.4.1. Fosfatidilcolina de Soja

A fosfatidilcolina é um tensoativo natural rapidamente difundido na interface óleo-água. Apresenta como característica funcional ser emoliente, agente emulsificante e agente solubilizante, podendo ser utilizada em preparações farmacêuticas injetáveis (intramuscular e intravenosa), formulações para nutrição parenteral, produtos tópicos e alimentícios. O EHL da fosfatidilcolina está na faixa de 3-4. Estas devem ser estocadas em frascos bem fechados e protegidos da luz, pois são facilmente oxidadas e se decompõem em extremos valores de pH (ROWE *et al.*, 2006).

As lecitinas são muito utilizadas como adjuvantes farmacotécnicos em comprimidos, preparações tópicas, vaginal e retal, suspensões, cápsulas, injeções intravenosas e intramusculares e preparações para uso inalatório (ROWE *et al.*, 2006).

A fosfatidilcolina (Figura 1) apresenta em sua estrutura duas longas cadeias de hidrocarbonetos, explicando sua forte hidrofobia e 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-tensoativo, como alcoóis de cadeia curta, para a formação das microemulsões (PARK *et al.*, 1999).

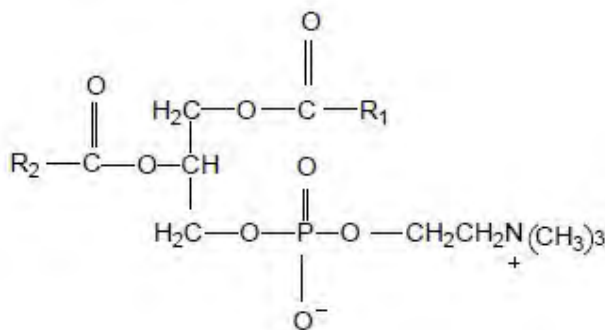


Figura 1: Estrutura química da fosfatidilcolina, onde R1 e R2 são ácidos graxos variáveis.

1.4.2. Oleato de Sódio

O oleato de sódio (Figura 2) é um sal sódico do ácido oléico, o eunatrol. É um tensoativo do tipo aniônico, utilizado como agente solubilizante em preparações farmacêuticas, apresentando EHL igual a 18 (Lachman, 2001).

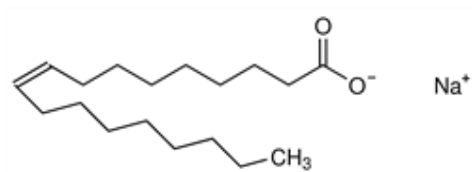


Figura 2: Estrutura química do oleato de sódio.

1.4.3. Óleo de Rícino Polioxil-40 hidrogenado (Eumulgin HRE 40)

O óleo de rícino é um tensoativo não-iônico, muito utilizado como adjuvante em formulações farmacêuticas de uso oral, tópico e parenteral. Apresenta como característica funcional ser agente emulsificante, solubilizante, molhante. Sua porção hidrofílica é composta por polietilenoglicóis e etoxilatos de glicerol (ROWE *et al.*, 2006).

O óleo de rícino etoxilado apresenta EHL na faixa de 14-16. Testes de toxicidade crônica e aguda em animais demonstram que derivados do óleo de rícino geralmente não são tóxicos nem causam irritações (ROWE *et al.*, 2006).

1.4.4. Colesterol

O colesterol (Figura 3) é de origem animal e apresenta como característica funcional ser emoliente e agente emulsificante, podendo ser utilizado em preparações farmacêuticas injetáveis, oftálmicas, tópicas e vaginais. O colesterol quando utilizado como excipiente, contorna problemas de toxicidade (ROWE *et al.*, 2006) e pode

modificar a velocidade de liberação de fármacos antitumorais aumentando a solubilidade e direcionamento para sítios específicos diminuindo assim a toxicidade destes fármacos (FORMARIZ, 2008; DIAS *et al.*, 2007).

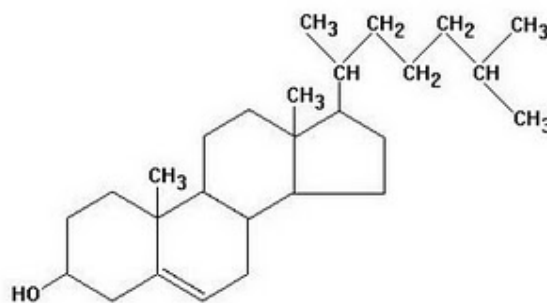


Figura 3: Estrutura química do colesterol.

1.5. Câncer

Entre as patologias atuais, as neoplasias têm sido mostradas como uma das maiores causas de morte da humanidade e, ainda hoje, esse perfil não se modificou consideravelmente, colocando as neoplasias como um sério problema de saúde pública no mundo (NOVAES e BEAL, 2004 e BRASIL-MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2007). No Brasil em 2006, foram registrados 130 mil óbitos e 470 mil casos novos. Entre 1979 e 2003, a taxa de mortalidade pela doença cresceu 30% e os gastos do governo federal na assistência oncológica de alta complexidade, entre 2000 e 2005, aumentaram em 103%. A realidade brasileira se insere no quadro mundial. Segundo a Organização Mundial de Saúde, o número estimado de novos casos de câncer crescerá de 10 milhões, em 2000, para 15 milhões em 2020. (BRASIL-MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2007).

O aumento mundial do número de casos de neoplasias tem provocado um avanço na pesquisa na busca de soluções para o controle desta patologia. Apesar dos inúmeros compostos naturais e sintéticos, utilizados no tratamento das neoplasias, as

particularidades biológicas inerentes a cada tipo de tumor associadas aos mecanismos intracelulares de resistência farmacológica (de etiologia multifatorial) aos quimioterápicos que as células tumorais podem desenvolver, e efeitos colaterais graves, impulsionam a pesquisa de novos compostos com ação antineoplásica (GOMES e MILANEZ, 1997; FORMARIZ *et al.*, 2004).

As metodologias utilizadas no 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. A busca por novos compostos antineoplásicos com maior eficácia e menor toxicidade tem sido alvo principal das pesquisas com sistemas nanoestruturados. Neste contexto, o desenvolvimento de sistemas microemulsionados poderá proporcionar não somente o aumento da concentração de fármaco no sítio de ação desejado, reduzindo os efeitos colaterais de forma a permitir a utilização dos fármacos já existentes, principalmente os de administração endovenosa (FORMARIZ *et al.*, 2004).

A avaliação experimental “*in vivo*” e “*in vitro*” de efeito antitumoral mostra que os métodos de triagem de fármacos utilizados até 1985, são úteis para tumores de crescimento rápido, tais como as leucemias e linfomas, mas não para outros tipos de tumores. Realmente o sucesso da quimioterapia é maior para os tumores relacionados com o sistema hematopoiético, enquanto que para os tumores sólidos as alternativas são escassas. Com o aprimoramento da técnica de cultura de células foi possível no final da década de 80, a manutenção de diversas linhagens celulares oriundas de tumores humanos, as quais possibilitaram o desenvolvimento da metodologia “*in vitro*”. O Instituto Nacional do Câncer dos Estados Unidos desenvolveu um painel de células cancerígenas que, atualmente, conta com 60 linhagens originadas de oito tipos de

tumores sólidos (pulmão, melanoma, mama, rim, cólon, próstata, ovário, cérebro) e do sistema hematopoiético (leucemia) tornando possível a avaliação “*in vitro*” da atividade antiproliferativa de drogas antineoplásicas com rapidez e eficiência. Esse teste permite analisar um grande número de amostras, em um período pequeno, possibilitando resultados rápidos sobre a atividade de novas substâncias, naturais ou de síntese (MONKS *et al.*, 1991).

A avaliação experimental de efeito antitumoral também utiliza tumores experimentais oriundos de animais, entre eles roedores, para realização dos testes preliminares “*in vivo*” (SOUSA, 2000). Os animais desenvolvem o câncer por mecanismos semelhantes aos humanos. Há mais de cinco décadas, são conhecidos tumores que se desenvolvem espontaneamente em animais de laboratório, como tumores de pele e estruturas associadas (MELO, 1996). Esse fato é de suma importância na terapia antitumoral experimental, devido a não utilização de agentes químicos e físicos, localização superficial, similaridade com tumores humanos, a rápida evolução, a fácil reprodução através de transplantação e variadas possibilidades de diferentes abordagens experimentais, sejam métricas ou paramétricas (YOUNG e HALLOWEA, 1973).

1.6. Antineoplásicos e toxicidade

Devido a falta de especificidade dos antineoplásicos pelas células tumorais, isto é, estes atingem também células normais, os indivíduos que fazem uso deste tipo de tratamento apresentam diversos efeitos colaterais, desde simples náuseas até mesmo toxicidade renal, hepática e cardíaca. Devido a alta toxicidade gerada pelos antitumorais atuais, existem estudos que buscam o uso de diferentes veículos capazes de direcionar o

fármaco aos tumores através do uso de microemulsões, lipossomas, enzimas e anticorpos (VAN BERKEL, 1994).

As lipoproteínas de baixa densidade (LDL) tem sido objeto de estudo como veículo que em associação ao antitumoral apresenta capacidade de direcionar o fármaco em locais que apresentem células neoplásicas. Isto ocorre porque a LDL é o principal carreador de colesterol no plasma humano e o colesterol é um dos principais constituintes da membrana celular. Quando ocorre divisão celular grande quantidade de colesterol é exigido para síntese da membrana celular gerando grande aumento de expressão de receptores de LDL. Em tecidos neoplásicos divisão celular ocorre abundantemente, já que novas células estão sendo formadas a todo instante (FAVERO e BYDLOWSKY, 2008). Em indivíduos que apresentam câncer existe uma diminuição nos níveis de colesterol e isto é proporcional ao grau de metastização e alta necessidade de colesterol pelas células malignas (HO *et al.*, 1978). As células cancerígenas sofrem proliferação tão rapidamente que necessitam de receptores de LDL de 3 a 100 vezes mais que as células normais (FAVERO e BLYDOWSKY, 2008).

Tendo em vista esta necessidade de colesterol pelas células neoplásicas, é interessante o desenvolvimento de sistemas que apresentem maior seletividade às células tumorais, não apenas formulações contendo colesterol veiculado mas também fármacos mais seletivos para células tumorais.

1.7. Jasmonatos e seus derivados

Os jasmonatos são conhecidos como hormônios vegetais produzidos e liberados durante uma situação de estresse vegetal. Dentre estas situações de estresse encontram-se radiação ultravioleta, choque osmótico, drogas citotóxicas, aquecimento, etc. (FLESCHER e FINGRUT, 2002).

Os jasmonatos foram primeiramente isolados do jasmim e mais tarde foi descoberto que os jasmonatos estão presentes na maioria dos vegetais fazendo parte do sistema de defesa vegetal. São compostos derivados de ácido graxo e contém o anel ciclopentanona em sua estrutura. Entre os jasmonatos de ocorrência natural (Figura 4) são conhecidos o ácido jasmônico (JA), o metil jasmonato (MJ) e o *cis*-jasmone (CJ) (COHEN e FLESCHER, 2009). O ácido jasmônico possui papel fundamental nas respostas de sinalização intracelular devido a uma injúria e o metil jasmonato promove indução de um inibidor de proteínas acumulando em baixas concentrações em resposta a uma lesão ou a um ataque patogênico (FARMER e RYAN, 1990). Os jasmonatos já têm sido objeto de patente para uma crescente variedade de derivados e indução de síntese de compostos vegetais. A síntese dos jasmonatos ocorre a partir do ácido linolênico através de uma rota enzimática 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 e 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 e FLESCHER, 2002; ROTEM *et al.*, 2005).

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*.

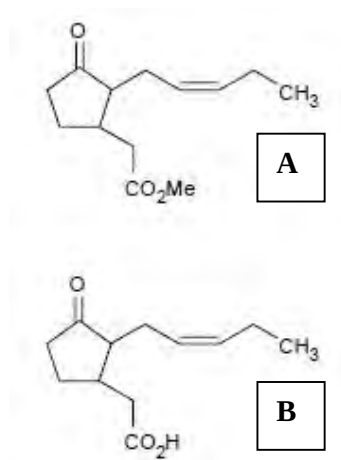


Figura 4: Estrutura química dos derivados do jasmonato de ocorrência natural, metiljasmonato (a) e ácido jasmônico (b).

Os jasmonatos compõem uma nova família de agentes anti-câncer, naturais e semi-sintéticos, com comprovada eficácia contra diversos tumores em crescimento, como leucemia e tumores cervicais, de mama, pulmão e próstata (KNIAZHANSKI *et al.*, 2008 e YERUVA *et al.*, 2008). Esses compostos exibem uma seletividade citotóxica em células transformadas (PEREIRA LOPES, *et al.*, 2010; FLESCHER, 2007; GOLDIN *et al.*, 2007; HEYFETS e FLESCHER, 2007 e ELIA e FLESCHER, 2008). São capazes de matar células com câncer de uma maneira independente da transcrição, tradução de proteínas e expressão de p53 (ROTEM *et al.*, 2005; GOLDIN *et al.*, 2007; HEYFETS e FLESCHER, 2007).

O mecanismo de ação dos jasmonatos ainda permanece incerto em sua totalidade, mas pesquisadores têm proposto três mecanismos para explicar a supressão do crescimento de células cancerosas pelo jasmonato. Esses mecanismos podem ocorrer

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

(1) O mecanismo bioenergético, onde o MJ causa perturbação mitocondrial, tanto em células cancerosas intactas como em mitocôndrias isoladas destas, através da abertura do Complexo Poro Transição Permeabilidade Mitocondrial resultando na liberação do citocromo C, gerando uma severa falta de ATP e conseqüente morte destas células. Entretanto células humanas normais não são afetadas pelo MJ, demonstrando uma seletividade dos jasmonatos pelas células cancerosas (ROTEM *et al.*, 2005; FLESCHER, 2007 e YERUVA *et al.*, 2008). Isso demonstra que as mitocôndrias das células com câncer possuem certas características específicas que as tornam sensíveis aos efeitos citotóxicos dos jasmonatos (FLESCHER, 2007).

(2) O mecanismo de indução de re-diferenciação pelo jasmonato tem sido usado como estratégia para normalizar as células com câncer, já que estas são indiferenciadas. A re-diferenciação é um processo onde o programa genético das células com câncer é modificado para trazer um genótipo e um fenótipo mais diferenciado (FLESCHER, 2007 e YERUVA *et al.*, 2008).

(3) O mecanismo mediador de espécies de oxigênio reativo (ROS): o MJ apresenta a capacidade de induzir a expressão de espécies oxigênio reativo. O envolvimento de ROS com MJ leva a indução de apoptose em células de câncer de pulmão através da geração de peróxido de hidrogênio e proteínas pro-apoptóticas da família Bcl-2 (FLESCHEZEKWUDO *et al.*, 2008 e YERUVA *et al.*, 2008).

O mecanismo bioenergético e o mediador de ROS induzem a apoptose levando a morte das células neoplásicas enquanto o mecanismo de re-diferenciação está associado à supressão da proliferação, demonstrando a ação antineoplásica dos derivados dos jasmonatos (FLESCHER, 2007).

Em razão da atividade antitumoral do MJ, de sua insolubilidade em meio aquoso e da necessidade de administração intravenosa para a terapia clínica, torna-se de grande relevância o desenvolvimento tecnológico de sistemas de administração seguros e que proporcionem a máxima eficiência terapêutica com a menor relação risco-benefício possível.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral:

O presente estudo tem como objetivo desenvolver sistemas microemulsionados contendo metiljasmonato para administração endovenosa, a caracterização físico-química e estrutural dos sistemas, a avaliação do potencial terapêutico e da toxicidade.

2.2. Objetivos específicos:

- Desenvolver sistemas microemulsionados, a partir da associação de Óleo de Rícino Polioxil-40-Hidrogenado (ORPH), Fosfatidilcolina de Soja (FS) e Oleato de Sódio (OS) como tensoativos, Colesterol (CHO) como fase oleosa e tampão Tris-HCl 0,01M, pH 7,2 como fase aquosa, capazes servirem como nanocarreadores para o metiljasmonato.
- Desenvolver e validar uma metodologia analítica por cromatografia acoplada a espectrômetro de massa (CG-MS) suficientemente sensível e segura para a determinação quantitativa do metiljasmonato em diferentes sistemas de administração.
- Proceder à caracterização físico-química e estrutural dos nanocarreadores na ausência e na presença de metiljasmonato.
- Realizar ensaios de liberação *in vitro* do MJ livre e a partir das microemulsões.
- Avaliar a atividade antiproliferativa do MJ e do MJ-ME, “*in vitro*” utilizando cultura de células tumorais humanas.
- Avaliar a toxicidade aguda (DL50) do MJ e do MJ-ME.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Materiais

3.1.2. Matérias-Primas, Reagentes e Solventes

- Ácido Acético Glacial, Ecibra[®], Labcenter;
- Ácido Clorídrico, Synth, Brasil;
- Ácido Oléico, Synth, Brasil;
- Álcool etílico comercial;
- Água deionizada Milli Q;
- Clorofórmio, Merck[®], Darmstadt, Alemanha;
- Colesterol, Sigma-Aldrich, USA;
- Dimetilsulfóxido de Sódio, Sigma[®];
- Fosfatidilcolina de soja (Epikuron[®] 200), Lucas Mayer, Alemanha;
- Gentamicina, Schering-Plough;
- Glicerol, Nutricell[®], Brasil;
- Hidróxido de Sódio, PA-ACS, Grupo Química, Brasil;
- Membrana de acetato de celulose 0,45µm - Sigma;
- Metanol, J. T. Baker;
- Metildiidrojasmonato, Aldrich-Sigma;
- Oleato de Sódio;
- Óleo de Rícino Polioxil-40-Hidrogenado (Eumulgin[®] HRE40), Pharma Special, Brasil;
- RPMI 1640, Gibco[®] (meio de cultura);
- Solução fisiológica estéril de NaCl 0,9%;
- Soro Fetal Bovino 5% Inativado, Gibco[®];

- Sulfarodamina B, Sigma[®];
- Tampão Hank's, Sigma[®];
- Tripsina, Nutricell[®], Brasil;
- Tris (hidroximetil) aminometano, Merck, Darmstadt, F.R. Germany.

3.1.3. Equipamentos

- Agitador magnético, P-Selecta, Multimatic-9S;
- Analisador de imagem, Leica DMR-Qwin;
- Analisador de partículas por Espalhamento de luz – Brookhaven Instruments Corporation,
modelo EMI 9863 – fonte laser He-Ne 10mW, 532nm – HUGHES; Auto correlator 64canais, instalado no Depto de Físico-Química, Instituto de Química – UNESP – Araraquara;
- Autoclave vertical, Phoenix;
- Balança analítica;
- Câmara de Neubauer, Optick Labor;
- Centrífuga SORVALL, modelo TC;
- Cromatógrafo a Gás acoplado a Detector de Massas Shimadzu GC 17A e Shimadzu GCMS-QP5050A;
- Cubetas de quartzo para espectrofotometria capacidade 5mL, caminho óptico de 1cm - Spectrocell;
- Difratorômetro 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 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;
- Peagômetro, Quimis[®], modelo Q-400 M2;
- Pipetador automático Gilson capacidade 10, 100 e 1000µL;
- 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. Preparação dos sistemas estabilizados por fosfatidilcolina de soja, oleato de sódio e óleo de rícino

Em frasco transparente foram transferidas quantidades adequadas de tensoativo não- iônico Óleo de Rícino Polioxil-40-Hidrogenado (ORPH) (Eumulgin[®] RH 40), Fosfatidilcolina de Soja (FS) (Epikuron[®] 200) e Oleato de Sódio (OS) na proporção de 7: 7: 3. Para cada proporção de FS/ORPH/OS foi adicionada fase oleosa e em seguida

foram tituladas com tampão Tris-HCl 0,01M, pH 7,2 (fase aquosa). Essa sequência de adição facilita a homogeneização da mistura, a qual foi sonicada usando Sonicador de haste, com potência de 220 Watts, operando de modo descontínuo, por 20 minutos com intervalos de 30 segundos a cada um minuto, com banho de gelo durante todo o processo de sonicação.

3.2.2. Diagramas de fase do sistema estabilizado por FS/ORPH/OS na ausência e na presença de 6% (m/v) de MJ.

Ao sistema tensoativo (**T**): FS/ORPH/OS, foi adicionada a fase oleosa (**O**), contendo colesterol. Para a obtenção do diagrama de fases foram usadas as relações de **T/O** na faixa de 1:9 até 9:1. À essa mistura semi-sólida (1,0g) contendo FS, ORPH, OS e Colesterol, foi adicionado o tampão Tris-HCl 0,01M, pH 7,2 (**A**) com uma pipeta automática, sob agitação em vórtex e submetida a ultrassom por 20 minutos à temperatura ambiente.

As transições de mistura semi-sólida para sistema líquido transparente (microemulsão), sistema transparente gel (microemulsão gel), sistema opaco gel (emulsão gel), sistema opaco líquido (emulsão) ou separação de fases foram detectadas visualmente, contra fundo escuro.

Posteriormente, preparou-se o diagrama de fase com adição de proporções fixas de 6% (m/v) MJ em todas as faixas de 1:9 até 9:1 (T/O).

A partir destes dados foram selecionados sistemas, em função do volume da fase oleosa e da porcentagem de tensoativos e estes foram submetidos à caracterização físico-química.

3.2.3. Caracterização físico-química dos sistemas selecionados

Os sistemas selecionados foram avaliados na ausência e na presença de 6% (m/v) de MJ.

Raio Hidrodinâmico das Gotículas por Espalhamento dinâmico de luz

O raio hidrodinâmico das gotículas da fase interna das ME foi determinado por espalhamento dinâmico de luz. A fonte de luz do aparelho é um laser de He-Ne de 10mW, comprimento de onda de 532 nm (Hughes, USA- Brookhaven Instruments Corporation).

Preparou-se 1g de cada formulação, que foram diluídas em tampão Tris-HCl 0,01 M pH 7,2, e colocadas em frascos de cintilação isentos de poeira. Os frascos foram colocados 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 90°C do 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.

Análise Reológica

As propriedades reológicas dos sistemas microemulsionados selecionados na presença e ausência de fármaco foram determinadas medindo-se o grau de cisalhamento em função da tensão de cisalhamento aplicada, usando-se equipamento Carri Méd CSL 100, reômetro com geometria cone-placa. As amostras foram colocadas sobre a placa e submetida a sucessivas velocidades de cisalhamento pela ação do movimento de rotação do cone. Dessa forma é possível construir o reograma de tensão de cisalhamento (τ) por

taxa de cisalhamento (γ), que possibilita o cálculo da viscosidade dinâmica dos materiais. 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).

Utilizou-se o cone de 4 cm de diâmetro e espaço de 105 μ m entre cone e placa. A velocidade de cisalhamento (γ) empregada variou de 0 a 300s⁻¹ e cada medida teve duração de 5 minutos. O comportamento reológico dos sistemas foi determinado utilizando gráficos representativos das curvas ascendentes e descendentes. Todas as determinações foram realizadas em triplicata a 25°C.

Microscopia de Luz Polarizada

As amostras dos sistemas estudados foram colocadas sobre lâmina de vidro, cobertas com lamínula e analisadas em microscópio de luz polarizada (Jenamed 2, Carl Zeiss – Jena).

A microscopia de luz polarizada (MLP) permite estudar estruturas anisotrópicas e birrefringentes. O microscópio de luz polarizada é um microscópio no qual, junto ao condensador, existe um polarizador, que orienta as ondas luminosas provenientes da fonte de luz em uma só direção, em um só plano. As alterações que uma substância birrefringente provoca na direção da propagação da luz, em um equipamento desse tipo, são feitas graças ao analisador, um segundo sistema de polarização, junto à ocular. O máximo de luz é obtido quando o polarizador e analisador estão com eixos em paralelo e, ao contrário, a luz extingue quando são perpendiculares (ABRAMOWITZ *et al.*, 2005).

Difração de Raios-X

O grau de cristalinidade ou o estado amorfo das amostras e dos componentes da ME (oleato de sódio, fosfatidilcolina de soja, óleo de rícino polioxil-40-hidrogenado e colesterol) foram analisados através de difratômetro de Raios-X Siemens D5000, com radiação de cobre monocromatizada por cristal de grafite. A velocidade de varredura foi de 0,1 segundos a cada $0,05^{\circ}$ com $2\theta^{\circ}$ variando de 4° a 70° .

3.2.4. Determinação do MJ em formulações por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa

Foi desenvolvido um método analítico para determinação de MJ em formulações por cromatografia gasosa acoplado à espectrometria de massas.

Sistema Cromatográfico a Gás acoplado à Espectrometria de Massas

Foi utilizado sistema de cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG-MS) [®] e os dados instrumentais deste sistema foram: temperatura do injetor 280°C , temperatura da interface 300°C , injeção no modo split (20:1), coluna DB-1 de 30 m x 0,25 mm e 0,1 μm de filme. A fase móvel foi constituída de gás Hélio com vazão de 1,0 mL/min. Rampa de temperatura: 100°C durante 3 minutos, $2^{\circ}\text{C}/\text{min}$ até 180° e $5^{\circ}\text{C}/\text{min}$ até 300° . A corrida com o detector de massas foi realizada no modo Full scan: 40 a 500 m/z.

Curva analítica MJ em tampão

A curva analítica foi obtida em intervalo de concentração de 0,1 a 1 mg/mL de MJ utilizando tampão Tris-HCl acrescido de 0,15% de laurilsulfato de sódio como

solvente. As determinações foram feitas em triplicata por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas. Foi construída uma curva analítica de MJ *versus* área do pico com o objetivo de determinar a liberação do fármaco no meio receptor durante o ensaio de dissolução.

3.2.5. Validação do método analítico

Os limites de confiança do método analítico foram determinados de acordo com as normas estabelecidas pela ANVISA (RE 899, 29 de maio de 2003), onde a validação do método foi obtida de acordo com sua finalidade, teste de performance, isto é, teste de liberação *in vitro* classificado de acordo com a resolução, na categoria III que exige avaliação do parâmetro: Precisão e além deste outros podem ser necessários como: Especificidade e Seletividade, Linearidade, Exatidão, Intervalo, Robustez, etc.

Especificidade e Seletividade: É a capacidade que o método possui de medir exatamente um composto em presença de outros componentes tais como impurezas, produtos de degradação e componentes da matriz. Em métodos cromatográficos, devem-se tomar as precauções necessárias para garantir a pureza dos picos cromatográficos. A utilização de testes de pureza de pico (por exemplo, espectrometria de massas) é interessante para demonstrar que o pico cromatográfico é atribuído a um só componente.

Linearidade: É a capacidade de uma metodologia analítica de demonstrar que os resultados obtidos são diretamente proporcionais à concentração do analito na amostra, dentro de um intervalo especificado.

Precisão: é a avaliação da proximidade dos resultados obtidos em uma série de medidas de uma amostragem múltipla de uma mesma amostra.

- **precisão intra-corrida (repetibilidade):** concordância entre os resultados dentro de um curto período de tempo com o mesmo analista e mesma instrumentação. A repetibilidade do método é verificada por, no mínimo, 9 (nove) determinações, contemplando o intervalo linear do método, ou seja, 3 (três) concentrações, baixa, média e alta, com 3 (três) réplicas cada ou mínimo de 6 determinações a 100% da concentração do teste;

- **precisão inter-corrida (intermediária):** concordância entre os resultados do mesmo laboratório, mas obtidos em dias diferentes, com analistas diferentes e/ou equipamentos diferentes.

3.2.6. Incorporação do MJ nos sistemas microemulsionados

A solubilidade da MJ nas ME foi verificada a partir de amostras previamente selecionadas. Foi transferido 1g da ME para um tubo de sonicação e adicionado MJ em excesso, até o sistema modificar suas características de transparência e fluidez. Foi, portanto incorporado a cada formulação 20% de MJ para o estudo da liberação *in vitro*.

3.2.7. Ensaio de liberação *in vitro*

Foi utilizado modelo de célula de difusão em sistema estático do tipo Franz adaptada ao equipamento de dissolução (Figura 5). O dispositivo apresenta uma tampa com três aberturas, sendo uma para coleta e reposição do meio de dissolução, uma, no centro, para a entrada do dispositivo de agitação e a terceira para a introdução de um cilindro de vidro que fica em contato com o meio receptor Tampão Tris-HCl acrescido de 0,15% de laurilsulfato de sódio. No cilindro foi colocada uma membrana de acetato

de celulose previamente hidratada, fixada por meio de um anel de borracha, sobre a qual é adicionada a amostra. Quantidades adequadas de amostra foram adicionadas sobre a membrana, evitando a formação de bolhas. A temperatura do sistema foi mantida a $37 \pm 0,2^{\circ}\text{C}$ e a agitação magnética foi mantida durante todo o processo a 100 rpm. Foram utilizados 25 mL de meio receptor, para garantir a condição Sink do experimento onde o volume de meio deve ser, pelo menos, três vezes maior do que o necessário para formar uma solução saturada do fármaco (BROWN *et al.*, 2004). Cada alíquota retirada para quantificação foi reposta com meio receptor. Pode-se dizer então que a concentração de fármaco dissolvido em um tempo t é muito menor que sua solubilidade no meio receptor. Se tal parâmetro é mantido, diz-se que o teste está sendo conduzido sob a *sink condition*, o que permite a difusão do fármaco pela membrana através de gradiente de concentração (GENNARO, 2000).

As determinações quantitativas de fármaco liberado foram realizadas por CG-EM em intervalos pré-determinados (2, 4, 6, 8, 10, 12 horas).

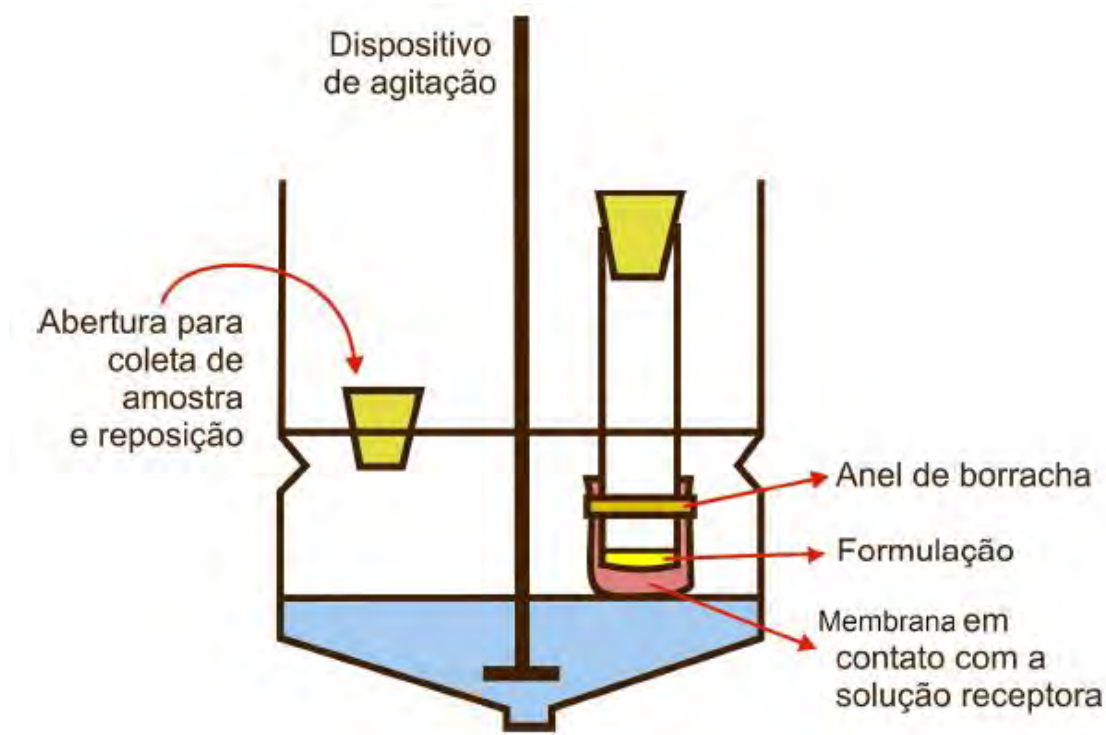


Figura 5: Esquema de célula de difusão adaptada ao dissolutor (CARVALHO, 2009).

3.2.8. Avaliação da atividade antiproliferativa *in vitro*

Esta etapa foi realizada em colaboração com o Prof. Dr. João Ernesto de Carvalho da Divisão de Farmacologia e Toxicologia (DFT) do CPQBA da UNICAMP.

Células

As linhagens celulares cedidas pelo National Cancer Institute (NCI) e utilizadas na triagem da atividade antiproliferativa estão relacionadas na tabela 1. Estas foram cultivadas em RPMI 1640 (Gibco®) suplementado com 5% de soro fetal bovino inativado (SFB) (Gibco®). O primeiro passo realizado foi o descongelamento e a propagação das mesmas. Posteriormente, foi realizado o congelamento para a obtenção

de um estoque destas linhagens celulares. Estas células foram fotografadas para uma avaliação geral de sua morfologia e estão representadas na figura abaixo.

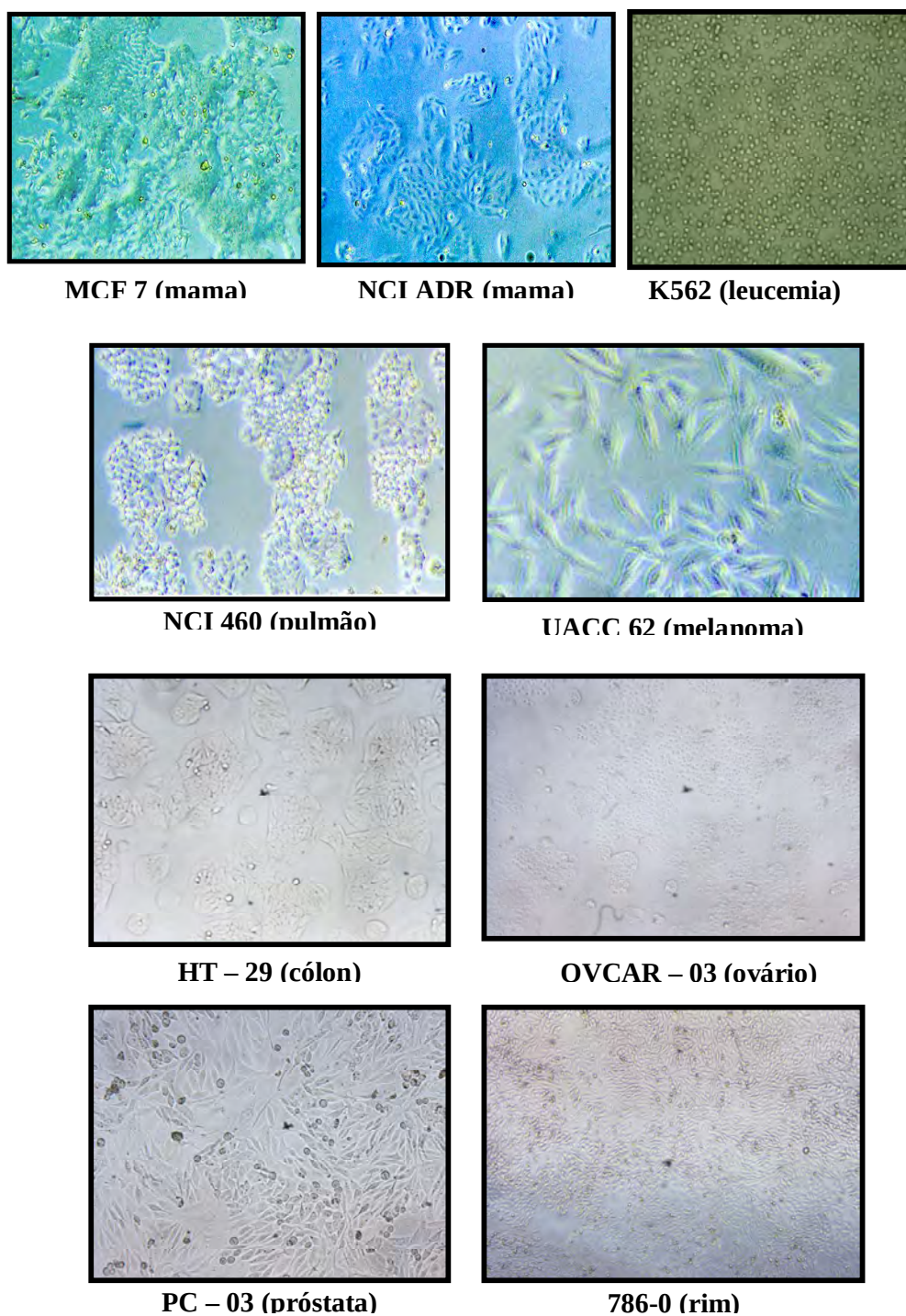


FIGURA 6: Linhagens celulares do CPQBA/UNICAMP (FORMARIZ, 2004).

As células foram mantidas em frascos (Nunc®) de 25 cm², com 5 mL de RPMI/SFB. Quando a monocamada celular formada pelas colônias atingiu cerca de 80% de confluência, estas foram repicadas, sendo mantidos sempre 2 frascos de cultura (Nunc®) de cada linhagem celular (frascos de manutenção). Estes frascos foram incubados a 37°C em atmosfera de 5% de CO₂ e 100% de umidade (Incubadora Forma®).

TABELA 1. Linhagens celulares utilizadas nos ensaios antiproliferativos.

<i>Tipo celular</i>	<i>Nome</i>	<i>Tipo de cultura</i>
Leucemia	K562	Suspensão
Cólon	HT-29	Aderida
Ovário	OVCAR-03	Aderida
Rim	786-0	Aderida
Próstata	PC-03	Aderida
Pulmão	NCI460	Aderida
Mama	MCF-7	Aderida
	NCI ADR *	Aderida
Melanoma	UACC-62	Aderida

* linhagem celular que expressa o fenótipo de resistência a múltiplas drogas.

Todos os procedimentos descritos abaixo foram realizados sob condições estéreis (Fluxo Laminar Veco®, Classe IIB).

Repiques celulares**Células aderidas**

Para as células cujo crescimento ocorre em monocamada, foi necessária a realização da tripsinização, ou seja, do desprendimento das mesmas do frasco através de ação enzimática. Após a aspiração do meio de cultura, foi adicionado 0,5 mL de tampão de Hank's (Sigma[®]) banhando toda a monocamada celular por 10 vezes consecutivas. Posteriormente, foi adicionado 0,5 mL de tripsina (Nutricell[®]) a 37°C. O frasco foi incubado por 25 a 30 segundos. Quando as células se desprenderam do fundo do frasco de cultura, este foi banhado com RPMI/SFB.

Descongelamento celular

O criotubo que continha as células foi mantido à temperatura ambiente para seu descongelamento sendo seu conteúdo transferido para um tubo de centrifuga de 15 mL (Nunc[®]). O volume foi completado para 10 mL com RPMI/SFB. O tubo foi centrifugado a 4° C e 2000 rpm por 4 minutos. O sobrenadante foi aspirado e o “*pellet* celular” foi ressuscitado cuidadosamente para evitar a formação de grumos, com 5 mL de RPMI/SFB. A solução celular foi transferida para um T₂₅ e incubada a 37°C em atmosfera de 5 % de CO₂ e 100 % de umidade.

Contagem celular

Com as células em suspensão, os frascos foram agitados e foi retirada uma alíquota, sendo esta colocada na Câmara de Neubauer (Optick Labor[®]). Os quatro quadrantes externos foram contados e determinados à média aritmética. Este valor foi multiplicado pelo fator de correção da câmara, equivalente a 10⁴.

Congelamento celular

As células da suspensão a serem congeladas foram contadas e transferidas para um tubo de centrífuga de 50 mL (Nunc®). O tubo foi centrifugado a 4°C e 2000 rpm por 4 minutos, o sobrenadante foi aspirado e o “*pellet* celular” ressuspendido em RPMI/SFB acrescidos de 10% de glicerol (Nutricell®) a 4°C, resultando em uma suspensão de concentração final equivalente a 1×10^6 cel / mL. O frasco foi mantido a 4°C e 1 mL da suspensão celular foi transferido para criotubos (Nunc®) rotulados que foram armazenados na fase gasosa do nitrogênio líquido por 24 horas. Após este período, os criotubos foram submersos no nitrogênio líquido.

Curva de crescimento para a determinação da densidade de inoculação

Para a determinação da concentração ideal de inoculação de cada célula em placas de 96 compartimentos (Nunc®), foi realizada uma curva de crescimento, onde foram inoculados 100 µL/compartimento de células em diferentes concentrações, de acordo com a tabela 2. No experimento foi utilizado RPMI/SFB, acrescidos de 50µg/mL de gentamicina (Schering Plough®). Após 24 horas de incubação a 37°C em atmosfera de 5% de CO₂ e 100% de umidade, foram adicionados mais 100 µL/compartimento de RPMI/SFB/gentamicina, para a obtenção do volume final de 200µL/compartimento. As leituras foram realizadas através do ensaio de sulforodamina B (SRB) (Sigma®), decorridas 24, 48, 72 e 96 horas após a inoculação.

TABELA 2: Concentrações celulares utilizadas na realização da curva de crescimento celular e densidade de inoculação (DI).

<i>Linhagem celular</i>	<i>Concentrações em células/mL</i>			<i>DI (células/mL)</i>
K562	$1,0 \times 10^5$	A	4×10^4	6×10^4
OVCAR-03	$7,5 \times 10^4$	A	$2,5 \times 10^4$	7×10^4
PC-03	$1,5 \times 10^5$	A	5×10^4	$4,5 \times 10^4$
786-0	$7,5 \times 10^4$	A	$2,5 \times 10^4$	5×10^4
HT-29	$7,5 \times 10^4$	A	$2,5 \times 10^4$	5×10^4
UACC 62	$1,5 \times 10^5$	A	5×10^4	4×10^4
MCF7	$7,5 \times 10^4$	A	$2,5 \times 10^4$	6×10^4
NCI ADR	$7,5 \times 10^4$	A	$2,5 \times 10^4$	5×10^4
NCI 460	10×10^5	A	5×10^4	4×10^4

Determinação da curva dose resposta do fármaco padrão

Como fármacos de referência foram utilizados os seguintes quimioterápicos: 5-fluorouracil (5-FU), camptotecina (CPT-11) e doxorubicina (DOX) (Sigma[®]), nas concentrações de 10^{-5} a 10^{-1} , 10^{-12} a 10^{-8} , 10^{-8} a 10^{-4} , respectivamente. No primeiro dia de experimento foram inoculados 100 µL de células em RPMI/SFB/gentamicina nas concentrações pré-determinadas. No tempo zero (24 horas após a inoculação da célula), foram adicionados 100µL de cada fármaco, sendo então, realizada a leitura da placa controle (T0), com o ensaio do SRB. As placas foram incubadas a 37°C em atmosfera de 5% de CO₂ e 100% de umidade por 48 horas, sendo então realizadas as leituras finais com o ensaio de SRB.

Ensaio de Sulfarrodamina B

As placas de 96 compartimentos foram centrifugadas por 3 minutos a 2000 rpm, e foram fixadas com 50 µL de ácido tricloroacético a 50% (TCA) (Merck®) a 4°C para as células aderidas. Para completar a fixação celular, as placas foram incubadas por 1 hora a 4°C.

As placas foram submetidas a quatro lavagens consecutivas com água destilada para a remoção dos resíduos de TCA, meio, SFB e metabólitos secundários. Estas placas foram mantidas à temperatura ambiente até a secagem completa.

Em seguida, as placas foram coradas pela adição de 50 µL SRB a 0,4 % (peso/volume) dissolvido em ácido acético a 1 %, durante um período de 30 minutos. Estas foram incubadas a 4 °C, em seguida, foram lavadas por 4 vezes consecutivas com uma solução de ácido acético 1%. O resíduo da solução de lavagem foi removido por gravidade e as placas foram novamente secas à temperatura ambiente. O corante ligado às proteínas celulares foi solubilizado com uma solução de Trizma Base® (Sigma®) na concentração de 10 µM e pH 10,5 por 5 minutos em ultra-som. A leitura espectrofotométrica da absorbância foi realizada em 540 nm em um leitor de microplacas (Elisa, Molecular devices).

Ensaio para a determinação da atividade antiproliferativa do MJ e do MJ na microemulsão

Foram inoculados 100 µL de células em meio RPMI/SFB/gentamicina, nas suas respectivas densidades de inoculação, em placas de 96 compartimentos. Estas foram incubadas por 24 horas a 37°C em atmosfera de 5% de CO₂ e 100% de umidade.

Decorridas 24 horas foram adicionados 100 μ L das amostras a serem testadas, sendo realizada neste momento, a leitura do T0. As demais placas foram incubadas por 48 horas. Após este período, foram realizadas as leituras pelo ensaio do SRB.

As amostras testadas foram o MJ e o MJ-ME. Como controle foi usado o Cloridrato de Doxorrubicina (Adriblastina[®] RD, Pharmacia, Brasil) e como branco a ME vazia, sem o MJ.

Diluição das amostras

As amostras foram diluídas em dimetilsulfóxido de sódio (DMSO) (Sigma[®]) na concentração de 1g/mL resultando em soluções estoques. As soluções estoques das amostras a serem adicionadas nas placas de 96 compartimentos dos experimentos foram então diluídas 400 vezes em RPMI/SFB/gentamicina, sendo assim obtida a concentração ideal para o teste, equivalente a 125 μ g/mL.

Curva dose resposta das amostras

As amostras no modelo descrito anteriormente foram submetidas a um ensaio a fim de relacionar a dose com os efeitos obtidos. A metodologia utilizada foi à mesma descrita anteriormente para o ensaio de atividade antiproliferativa, porém foram adicionadas as amostras nas doses de 250; 25; 2,5; 0,25 μ g/mL. A diluição das amostras foi realizada em RPMI/SFB/gentamicina.

Análise dos resultados

Foram calculadas as médias das absorbâncias descontadas de seus respectivos brancos e através da fórmula a seguir, foi determinada a inibição de crescimento (IC) de cada amostra testada.

MACT > C, o fármaco estimulou o crescimento, não apresenta IC.

Se MACT $\geq$ T0, mas < C, o fármaco foi citostático e a fórmula utilizada é $100 \times [(T - T_0)/(C - T_0)]$.

Se MACT < T0 o fármaco é citocida e a fórmula utilizada é $100 \times [(T - T_0)/(C - T_0)]$.

Sendo que MACT é a média da absorbância da célula tratada;

C é o controle de célula;

T0 é o controle das células no dia da adição das amostras.

O resultado obtido foi subtraído de 100% obtendo-se então a porcentagem de inibição de crescimento. As amostras foram consideradas ativas quando apresentaram inibição de crescimento maior que 50% e ainda de forma dose dependente.

3.2.9. Avaliação da toxicidade aguda

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 Colégio Brasileiro de Experimentação Animal – COBEA 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 concedendo PARECER FAVORÁVEL à sua execução, de acordo com Protocolo CEP/FCF/CAR nº 22/2009.

Casuística

Para a determinação da dose letal média (DL₅₀) do MJ e das ME-MJ foram utilizados camundongos Swiss, com peso médio de 30g, provenientes do Biotério Central da Universidade Estadual Paulista-Unesp. Os animais foram transferidos para o Biotério de Experimentação do Departamento de Fármacos e Medicamentos da

Faculdade de Farmácia Bioquímica da UNESP de Araraquara, onde foram mantidos em condições controladas de temperatura ($23 \pm 1^\circ \text{C}$), umidade ($55 \pm 5\%$) e luz (ciclo 12/12h, luzes acesas às 7hs) e receberam alimento e água à vontade. Os animais foram separados em 8 grupos de 5 animais cada, por tratamento, mais 3 grupos controle de 5 animais cada. Os experimentos foram realizados na fase de claro.

Delineamento experimental

Cinquenta e cinco camundongos Swiss machos foram selecionados em função do peso e dispostos em 11 grupos de 5 animais, sendo três grupos controle (solução salina, solução salina com 3% de Tween 20 e ME vazia), 4 grupos experimentais de 5 animais (MJ livre) e 4 grupos experimentais de 5 animais (MJ-ME). Os animais dos grupos controle receberam solução salina estéril, solução salina estéril com 3% de tween 20 ou ME vazia via intraperitoneal e aqueles dos grupos experimentais receberam as doses de 70, 140, 280 e 350 mg/kg de MJ livre ou MJ-ME pela via intraperitoneal, em dose única. A seguir, foram observados os sintomas apresentados pelos animais e/ou a morte dos mesmos durante 14 dias. A agulha utilizada para administração intraperitoneal nos camundongos foi de 0,45 x 13 mm (BIGHETTI *et al.*, 2004). O resultado foi considerado positivo quando ocorreu morte de 50% dos animais testes em uma das doses selecionadas.

Considerações Éticas Em Relação Aos Animais Experimentais

Os animais utilizados neste estudo foram procedentes do Biotério da Universidade Estadual Paulista-UNESP, Campus de Botucatu, e foram transportados até o biotério do Departamento de Fármacos e Medicamentos 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. Após o final dos experimentos, os animais sacrificados foram acondicionados em sacos plásticos apropriados e depositados num 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. Diagrama de fases para o sistema estabilizado por FS/ORPH/OS.

Nas figuras 7 e 8, estão representados os sistemas obtidos através da titulação com fase aquosa nas diferentes proporções de sistema tensoativo/fase oleosa (9:1 até 1:9), na ausência e presença de MJ, respectivamente.

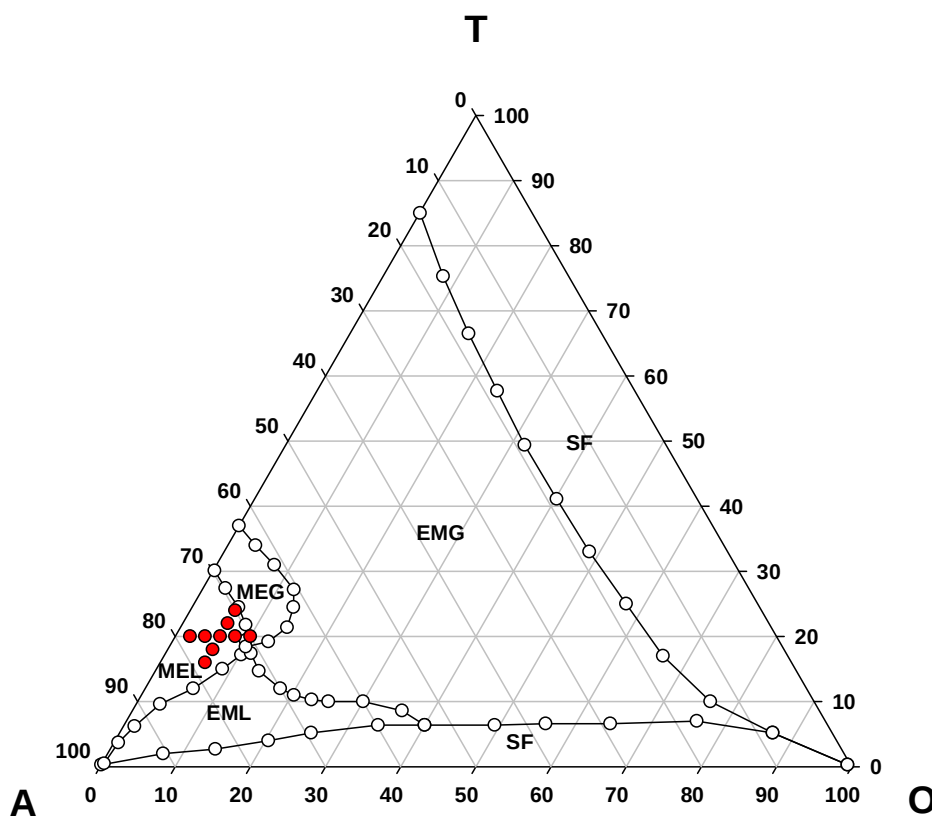


Figura 7: Diagrama de fases pseudoternário de sistemas contendo FS/ORPH/OS (T), Colesterol (O) e Tampão Tris-HCl (A). Legenda: Microemulsão (MEL), Microemulsão Gel (MEG), Emulsão líquida (EML), Emulsão Gel (EMG) e Separação de fases (SF). Pontos em vermelho representam os sistemas caracterizados físico-quimicamente.

A região de ME líquida foi obtida acima de 70% de fase aquosa, com até 10% de fase oleosa e sistema tensoativo variando entre 5 e 30%. A região de ME gel existe entre 60-70% de fase aquosa, até 15% de fase oleosa e entre 20 e 40% de sistema tensoativo. Sistema de emulsão líquida também foi obtido, isto é sistema opaco, com fase aquosa acima de 55%, com até 40% de fase oleosa e até 20% de tensoativos. Já para emulsões géis uma ampla faixa foi adquirida através do diagrama: de 15 a 70% de fase aquosa, de 5 a 85% de tensoativo e até 85% de fase oleosa.

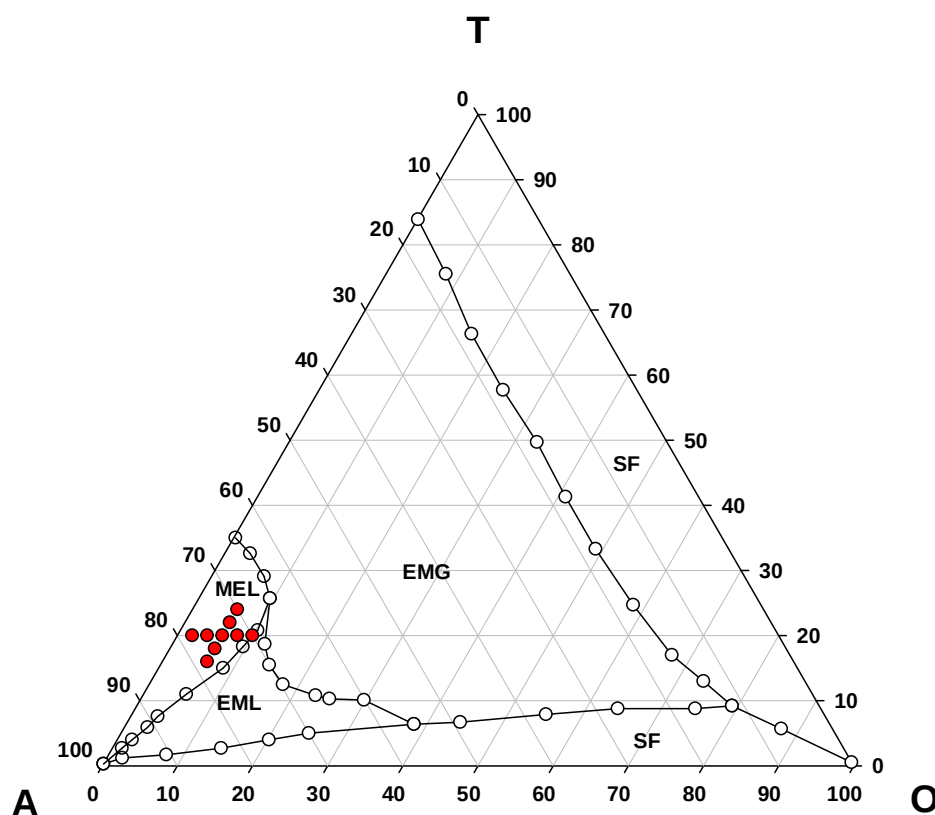


Figura 8: Diagrama de fases pseudoternário de sistemas contendo Metiljasmonato, FS/ORPH/OS (T), Colesterol (O) e Tampão Tris-HCl (A). Legenda: Microemulsão (MEL), Emulsão líquida (EML), Emulsão Gel (EMG) e Separação de fases (SF). Pontos em vermelho representam os sistemas caracterizados físico-quimicamente.

Pouca alteração ocorreu no diagrama quando o MJ foi adicionado (Figura 8). Com a adição do fármaco o sistema de microemulsão gel deixou de existir, aumentando a região de ME líquida em relação ao diagrama de fases na ausência de MJ, que está localizada acima de 65% de água, abaixo de 10% de fase oleosa e até 35% de sistema tensoativo. O sistema de emulsão líquida encontra-se na região de até 40% de fase oleosa, acima de 65% de fase aquosa e sistema tensoativo em até 25%. Já a região de emulsão gel se encontra localizada de 15 a 70% de fase aquosa, de 5 a 85% de tensoativos e até 80% de fase oleosa.

Com o aumento da proporção de sistema de tensoativos, em ambos os diagramas, e em baixas proporções de fase aquosa e altas proporções de fase oleosa o sistema torna-se muito viscoso. Isto pode ocorrer devido ao uso da fosfatidilcolina de soja, a qual apresenta a propriedade de gelificar quando absorve pequenas quantidades de água. Essa propriedade ocorre, pois a fosfatidilcolina (EHL = 4) é muito lipofílica e devido a esse fator há a necessidade de ser utilizada juntamente com co-tensoativos, geralmente alcoóis de cadeia curta, que apresentam maior grau de hidrofília (TROTТА, *et al.*, 2002; TROTТА, 1999), como é o caso do óleo de rícino (EHL = 14) e do oleato de sódio (EHL = 18) que apresentam predominância hidrofílica em sua estrutura molecular, permitindo maior absorção da fase aquosa. O diagrama mostra que com o aumento da proporção de fase oleosa, o sistema torna-se mais viscoso e isto ocorre novamente pelo alto grau de lipofília, porém nesse caso devido também à grande quantidade de colesterol.

Assim o óleo de rícino e o oleato de sódio foram adicionados à fosfatidilcolina de soja aumentando a hidrofília do sistema tensoativo promovendo maior flexibilidade do filme interfacial, gerando a mistura de tensoativos (FS/ORPH/OS) com a intenção de obter sistemas microemulsionados através da redução máxima da tensão interfacial.

Apesar das regiões de microemulsão serem pequenas, quando o sistema passou a apresentar essas características ele permaneceu inalterado, não se transformou em outro tipo de sistema independente do aumento de diluição com fase aquosa. Quando a região de ME líquida é formada, à medida que aumentamos a quantidade de fase aquosa adicionada aos sistemas podemos realizar diluição infinita sem que este se torne emulsão (TROTТА, 1999).

4.2. Caracterização físico-química dos sistemas selecionados

A partir da região de ME obtida através dos diagramas de fase, formulações (Tabela 3) foram selecionadas (representadas como pontos vermelhos nos diagramas na Figura 7 e 8), para desenvolvimento da próxima etapa deste trabalho. Estes foram divididos em dois grupos: De A até E, onde a proporção de tensoativos foi mantida constante (20%) variando a fase oleosa de 2 a 10%. E o outro grupo de F até I, onde a fase oleosa foi mantida constante (6%) variando o sistema tensoativo de 16 a 24%.

Nesta etapa do trabalho, nas formulações avaliadas na presença do fármaco foram incorporados 6% de MJ.

Tabela 3: Composição das formulações selecionadas para a sequência do trabalho.

Formulação	Fase	Tensoativos	O/T	Fase
	Oleosa (%)	(%)		Aquosa (%)
A	2	20	0,1	78
B	4	20	0,2	76
C	6	20	0,3	74
D	8	20	0,4	72
E	10	20	0,5	70
F	6	16	0,375	78
G	6	18	0,333	76
C	6	20	0,3	74
H	6	22	0,27	72
I	6	24	0,25	70

Uma vez selecionados os sistemas, realizou-se a caracterização físico-química destes, com o objetivo de avaliar o efeito da fase oleosa e do sistema tensoativo nas ME.

Determinação do Raio Hidrodinâmico por Espalhamento de luz

A técnica de espalhamento dinâmico de luz fornece o raio hidrodinâmico das partículas coloidais e esta técnica é baseada no movimento Browniano das gotículas em dispersão (FANKHAUSER, 2010). As amostras foram diluídas, 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).

A intensidade da luz espalhada é medida em diferentes ângulos, pois devido ao movimento browniano das partículas, o espalhamento ocorre em várias direções (GRASSI, 2006). A técnica consiste em atravessar a amostra com um feixe de laser, geralmente He-Ne 532 nm, de modo que as gotículas presentes no meio espalhem a luz. A luz espalhada é captada por um sinal que é enviado ao correlator, no qual é realizado o processamento dos dados. Estes são enviados para um software que realiza os cálculos fornecendo os valores de tamanho médio e índice de polidispersidade, entre outros (PESTANA, 2009).

A determinação do raio hidrodinâmico foi realizada nas amostras de A até I e os valores estão demonstrados na tabela 4.

Tabela 4: Raio hidrodinâmico.

Formulação	Raio Hidrodinâmico (nm)			
	ME vazia		Presença de MJ	
	Média	Desvio	Média	Desvio
A (2%O; 20%T; 78%A)	168,0	4,255	56,8	0,398
B (4%O; 20%T; 76%A)	181,1	0,142	64,9	0,432
C (6%O; 20%T; 74%A)	138,9	0,454	75,2	0,213
D (8%O; 20%T; 72%A)	80,1	0,197	36,7	0,125
E (10%O; 20%T; 70%A)	47,4	0,717	11,6	0,000
F (6%O; 16%T; 78%A)	85,3	0,350	75,6	0,257
G (6%O; 18%T; 76%A)	95,1	0,453	53,6	0,349
C (6%O; 20%T; 74%A)	138,9	0,454	75,2	0,213
H (6%O; 22%T; 72%A)	172,2	0,688	73,7	0,166
I (6%O; 24%T; 70%A)	165,3	0,281	43,7	0,078

A figura 9 mostra a relação do raio hidrodinâmico e a razão fase oleosa/tensioativos nas microemulsões vazias.

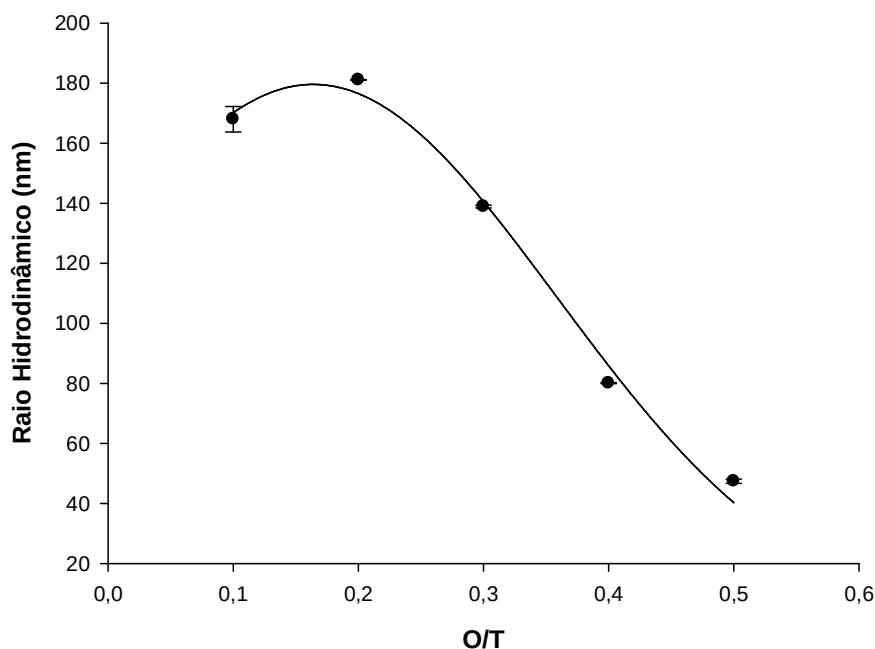


Figura 9: Variação do raio hidrodinâmico em função da razão O/T na ausência de metiljasmonato.

Os resultados mostram que o raio hidrodinâmico diminui com o aumento da fase oleosa em relação ao sistema tensoativo. Com até 4% de fase oleosa o raio permanece praticamente constante entre 168,0 e 181,1 nm, mas com o aumento subsequente da fase oleosa o raio cai bruscamente nas ME vazias. Isto ocorre, pois o colesterol pode estar se comportando como tensoativo acima de 4%. Até 4% o colesterol exerce um efeito insignificante no raio hidrodinâmico. Acima deste valor as proporções da mistura O/T proporcionam redução acentuada no raio, gerando um sistema opticamente transparente ou translúcido de reduzida tensão interfacial. Apesar de o colesterol ser predominantemente hidrofóbico pela presença em sua estrutura de anéis e cadeia de hidrocarbonetos, ele apresenta propriedade anfifílica e frações de seus componentes podem estar na interface óleo-água (FORMARIZ *et al.*, 2008), agindo como tensoativo e reduzindo o raio hidrodinâmico.

A figura 10 mostra a relação do raio hidrodinâmico com a proporção O/T nas ME na presença de MJ.

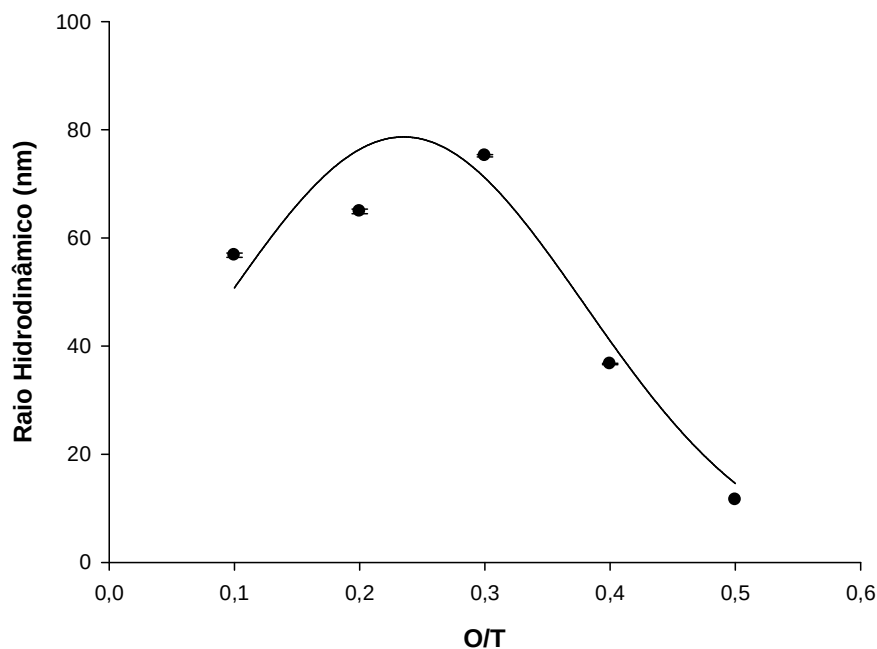


Figura 10: Variação do raio hidrodinâmico em função da razão O/T na presença de metiljasmonato.

A incorporação de MJ nas ME diminui acentuadamente o raio hidrodinâmico de 168 nm para 56,8 nm em baixas proporções da razão O/T e em altas proporções de 47,4 nm para 11,6 nm. A incorporação do MJ aos sistemas deve estar favorecendo a estabilidade termodinâmica destas ME, porque o anel hidrofóbico do fármaco se direciona para a fase oleosa no interior da ME enquanto a fração hidrofílica deve estar atraída para a região aquosa. Esta interação pode ser responsável pela diminuição do raio de curvatura das ME, reduzindo ainda mais o diâmetro das gotículas (FORMARIZ, 2004).

E com o aumento da proporção O/T, o raio hidrodinâmico aumenta até a razão de 0,3, diminuindo bruscamente acima de 0,3. O perfil deste gráfico é semelhante ao anterior, demonstrando que com uma razão de até 0,3 de O/T na presença do fármaco, o colesterol age predominantemente como fase oleosa e acima disso passa a agir também como tensoativo, diminuindo o raio hidrodinâmico e assim reduzindo a tensão superficial.

A figura 11 mostra a relação entre o raio hidrodinâmico e o aumento da porcentagem de tensoativo na ausência de MJ.

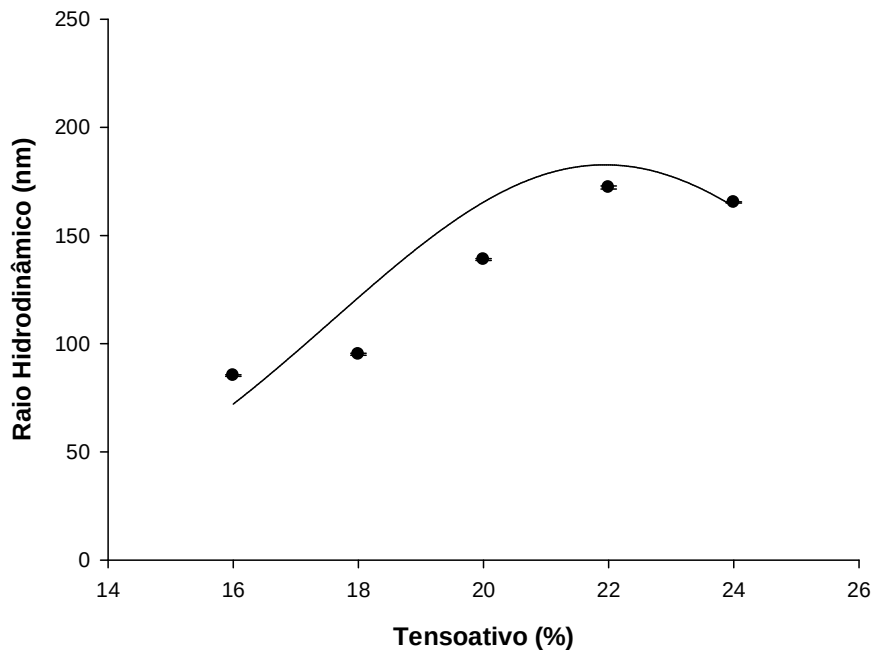


Figura 11: Variação do raio hidrodinâmico em função da porcentagem de tensoativo na ausência de metiljasmonato.

Na ausência de MJ, com o aumento da porcentagem de tensoativos, o raio hidrodinâmico aumenta com de 16 a 20% (85,3 até 185,5 nm). Acima de 20% o diâmetro sofre pouca variação, entre 138,9 e 165,3 nm. Estes resultados indicam que com até 18% de tensoativos, o sistema tensoativo se comporta de modo a estabilizar o

sistema termodinamicamente e acima deste valor há uma tendência de estabilização onde os raios permanecem praticamente constantes.

A figura 12 mostra a relação entre o raio hidrodinâmico e o aumento da porcentagem de tensoativos na presença de MJ.

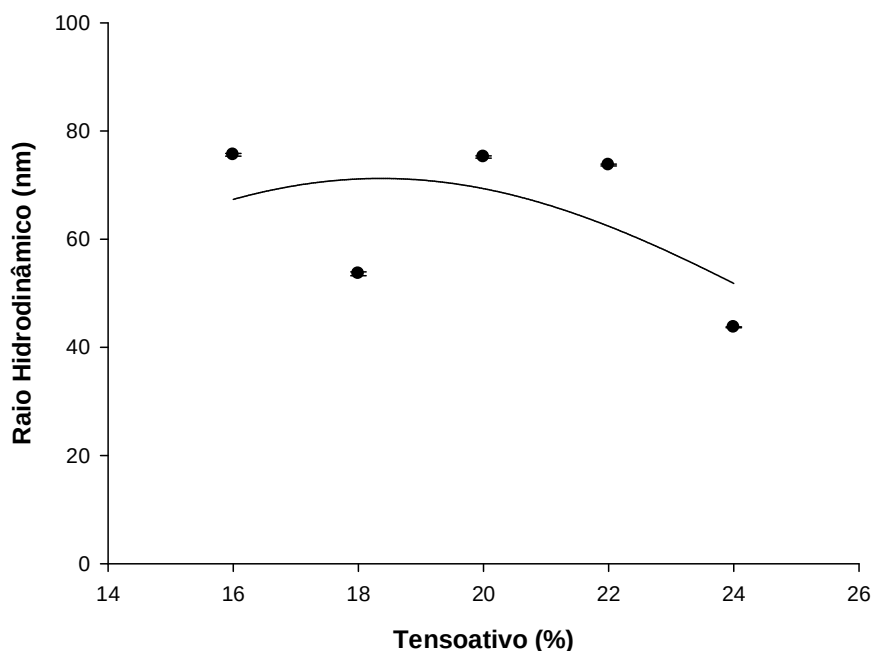


Figura 12: Variação do raio hidrodinâmico em função da porcentagem de tensoativo na presença de metiljasmonato.

Não houve diferença significativa no raio hidrodinâmico das microemulsões com MJ variando o tensoativo de 16 a 24%. O raio variou entre 43,7 e 75,6 nm diminuindo com a incorporação do MJ (Figura 12) em relação às ME vazias (Figura 11) onde a média dos raios variou entre até 85,3 até 165,3 nm. Novamente ocorreu diminuição da média do raio hidrodinâmico com a incorporação do fármaco.

O raio hidrodinâmico foi menor que 200 nm, isto indica que estas formulações podem ser aplicadas por via intravenosa (TROTТА, 1999).

Análise Reológica

Reologia é o estudo do fluxo e deformação dos materiais quando submetidos a uma tensão (WOOD, 1986). Esta técnica 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).

As curvas de fluxo são resultados gráficos do comportamento de fluxo de um líquido, onde é correlacionada a tensão de cisalhamento e a taxa de cisalhamento. As curvas de fluxo são representadas pela curva ascendente e curva 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. O que 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 drástica 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. Já 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 reproduzível 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).

O comportamento reológico dos sistemas microemulsionados com e sem fármaco foi avaliado através do ensaio de escoamento.

As figuras 13 e 14 mostram a influência da proporção da fase oleosa sobre o comportamento reológico das ME estabilizadas com 20% de tensoativo na ausência e presença do fármaco respectivamente. É possível notar que todas as amostras apresentam fluxo não-newtoniano, pois não apresentam linearidade entre a tensão e a velocidade de cisalhamento comportando-se como fluídos pseudoplásticos.

Nas ME vazias (Figura 13), nas proporções de 2, 4 e 6% de fase oleosa os reogramas indicam presença de tixotropia nesses sistemas com perfil reconstrução tempo dependente, enquanto os sistemas com 8 e 10% de fase oleosa apresentam reconstrução tempo independente, isto é, as curvas ascendentes e descendentes se sobrepõem.

Com a incorporação de MJ (Figura 14), os sistemas com mais de 4% de fase oleosa apresentaram comportamento anti-tixotrópico. Entre as curvas existe um laço de histerese. Apenas a formulação contendo 2% de colesterol na presença do fármaco apresentou perfil tempo independente.

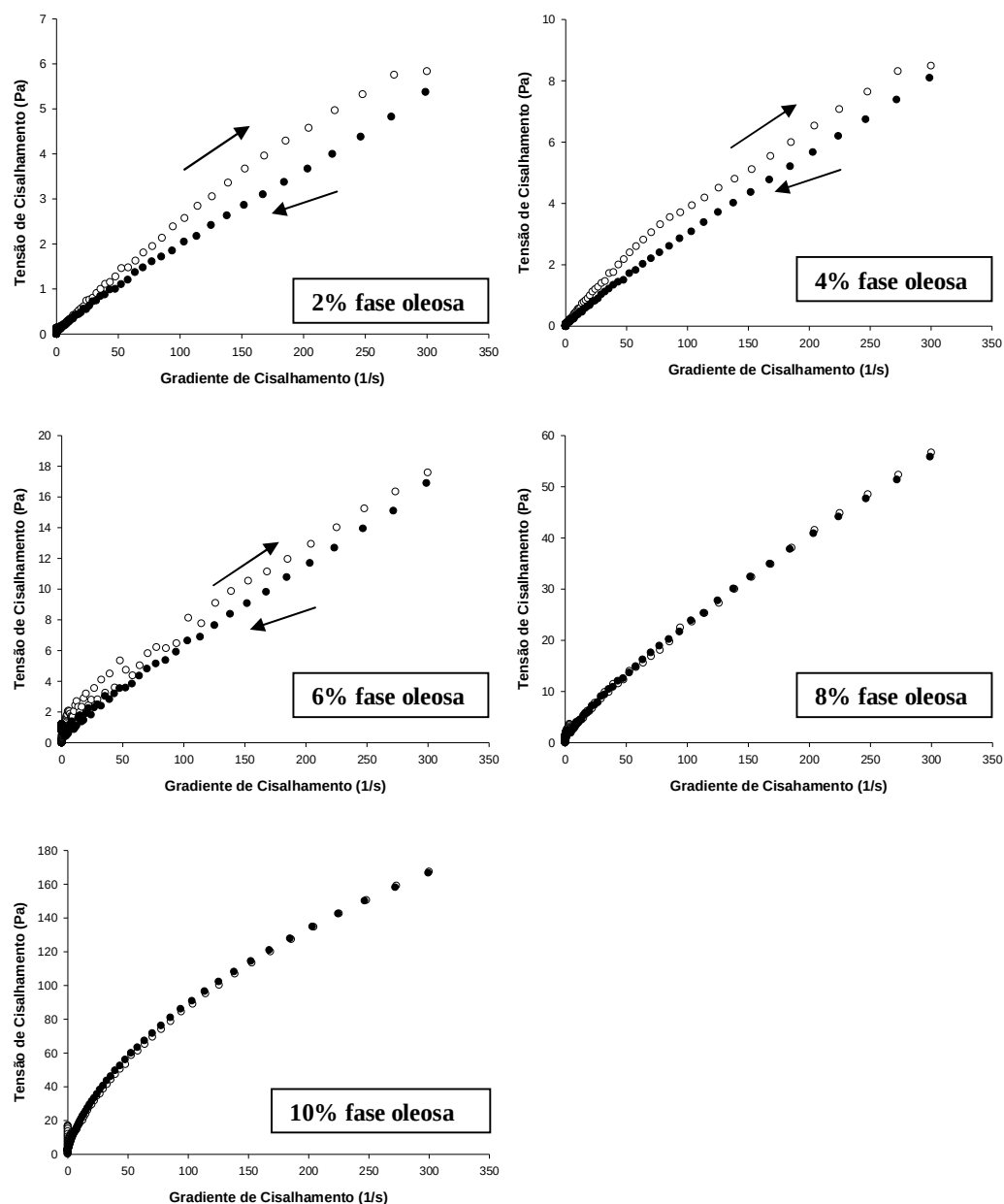


Figura 13: Perfil reológico das microemulsões vazias em função da proporção de fase oleosa. As curvas ascendentes e descendentes estão representadas, respectivamente, por símbolos vazios e cheios.

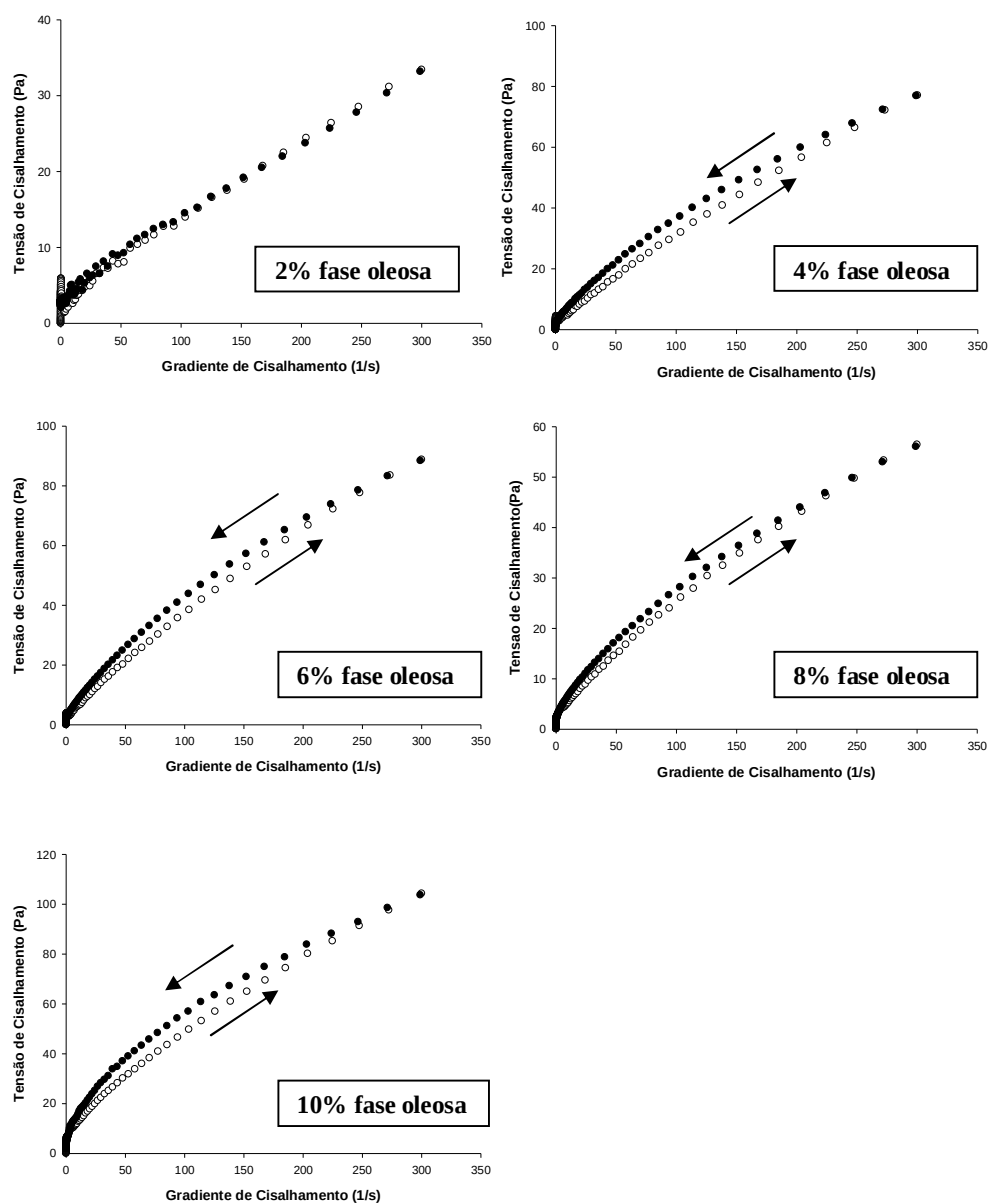


Figura 14: Perfil reológico das microemulsões em função da proporção de fase oleosa, na presença de metiljasmonato. As curvas ascendentes e descendentes estão representadas, respectivamente, por símbolos vazios e cheios.

As figuras 15 e 16 mostram a influência da proporção de tensoativos sobre o comportamento reológico das ME na ausência e presença do fármaco respectivamente. Estas figuras demonstram que os sistemas apresentam comportamento não-newtoniano sem limite de escoamento. Na ausência do fármaco (Figura 15), os sistemas com 16 a 22% de tensoativo obtiveram comportamento tixotrópico. Com o aumento da proporção de tensoativo a magnitude da tixotropia, isto é, o laço de histerese, foi diminuindo. Até que na proporção de 24% de sistema tensoativo o sistema passa a ser tempo independente, onde a curva inferior é sobreposta pela superior.

Na presença do fármaco (Figura 16) a amostra de 16% de tensoativo é tempo independente. Já a amostra com 18% de tensoativo apresenta tixotropia, enquanto acima de 20% as amostras apresentam anti-tixotropia, aumentando o laço de histerese com o aumento da proporção de sistema tensoativo.

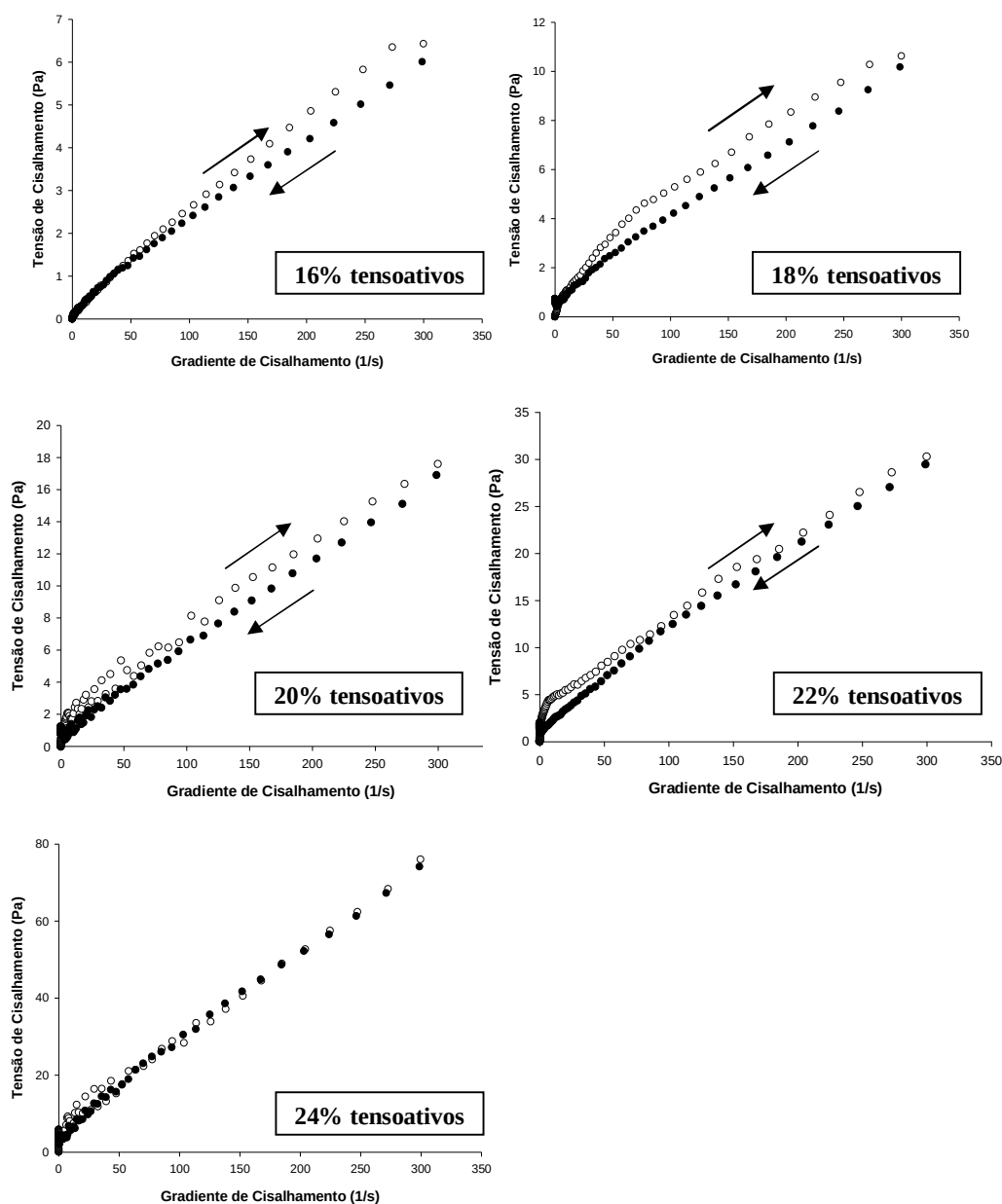


Figura 15: Perfil reológico das microemulsões vazias em função da proporção de sistema tensoativo. As curvas ascendentes e descendentes estão representadas, respectivamente, por símbolos vazios e cheios.

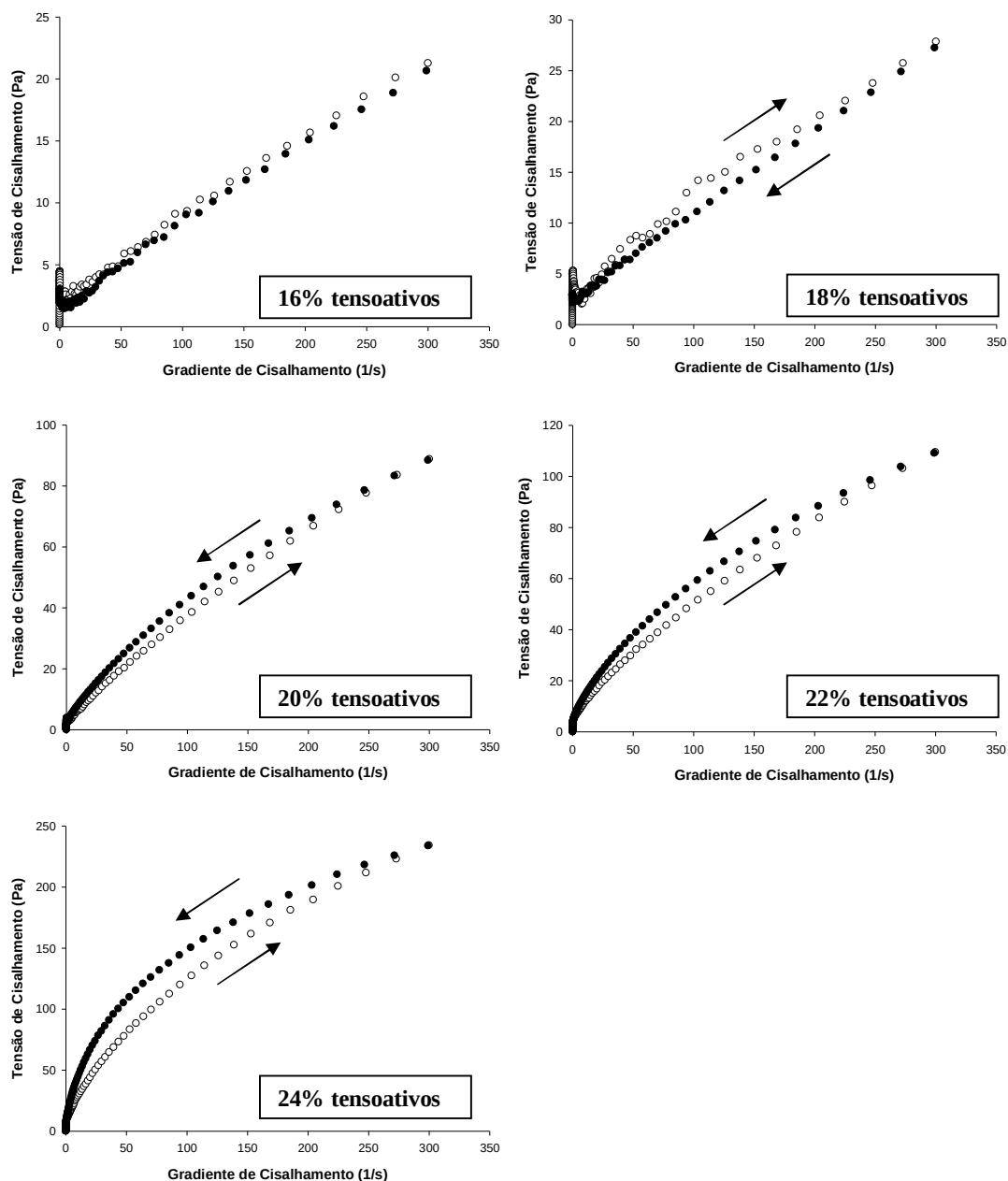


Figura 16: Perfil reológico das microemulsões em função da proporção de sistema tensoativo, na presença de metiljasmonato. As curvas ascendentes e descendentes estão representadas, respectivamente, por símbolos vazios e cheios.

Independente da variação de porcentagem de fase oleosa e de sistema tensoativo nos sistemas estudados foi possível observar que o raio hidrodinâmico e o comportamento reológico estão relacionados. As formulações estudadas sem o MJ apresentaram tixotropia e obtiveram raio hidrodinâmico maior na ausência do fármaco, já com a incorporação do fármaco os sistemas passaram a ser anti-tixotrópicos e obtiveram redução no raio hidrodinâmico. A incorporação do fármaco favoreceu a estruturação interna destes sistemas de modo a obter o mesmo comportamento reológico com a redução do raio hidrodinâmico.

Com base nos resultados obtidos, foi utilizado o modelo de lei de potência para confirmar o comportamento do fluxo e o índice de consistência, este modelo pode ser descrito pela equação:

$$\tau = k \cdot \dot{\gamma}^n$$

, onde: τ é a taxa de cisalhamento, k é o índice de consistência, $\dot{\gamma}$ é

a tensão de cisalhamento e n é o comportamento de fluxo.

Neste modelo, $n > 1$ representa um fluido dilatante, $n < 1$ representa um fluido pseudoplástico e $n = 1$ representa um fluido newtoniano. A tabela 5 apresenta o comportamento de fluxo e o índice de consistência das formulações com e sem MJ, variando proporção de fase oleosa e de sistema tensoativo. A partir dos resultados é possível confirmar que todas as formulações apresentam comportamento pseudoplástico por apresentarem $n < 1$.

Tabela 5: Comportamento de fluxo (n) e índice de consistência (K) para as formulações preparadas com proporções fixas de tensoativo e crescentes de fase oleosa e proporções fixas de fase oleosa e crescentes de tensoativos na presença e ausência de MJ.

ME	Ausência MJ		Presença MJ	
	K	n	K	n
A	0,05018	0,84505	0,7782	0,64393
B	0,10471	0,77688	0,78189	0,80472
C	0,35688	0,67389	1,03655	0,78135
D	0,61457	0,79011	1,05904	0,69521
E	5,35092	0,60428	3,11617	0,60712
F	0,04821	0,8654	0,76823	0,56368
G	0,22331	0,68075	1,59273	0,47074
C	0,35688	0,67389	1,03655	0,78135
H	0,92587	0,59673	2,47851	0,65963
I	1,31383	0,69396	7,59283	0,60494

Através da análise da Tabela 5, é possível notar que o índice de consistência (K) aumenta com o aumento da porcentagem de fase oleosa e de sistema tensoativo.

Microscopia de Luz Polarizada

Outra maneira de classificar as MEs é quanto à isotropia óptica através da microscopia de luz polarizada. 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. São estruturas isotrópicas se não desviarem a luz como ocorre em ME e mesofases cúbicas,

sendo visualizadas como campo escuro (NORLING *et al.*, 1992; BRINON *et al.*, 1999; HYDE, 2001).

As amostras foram analisadas através da microscopia de luz polarizada. Na figura 17 estão demonstrados os sistemas estabilizados com 20% de tensoativo variando a proporção de fase oleosa na ausência do fármaco. É possível notar a presença de “cruzes de malta”, sempre em pequena quantidade denotando serem estruturas de fase lamelar sendo, portanto, anisotrópicas. Com o aumento da proporção de fase oleosa ocorreu aumento da organização estrutural do sistema.

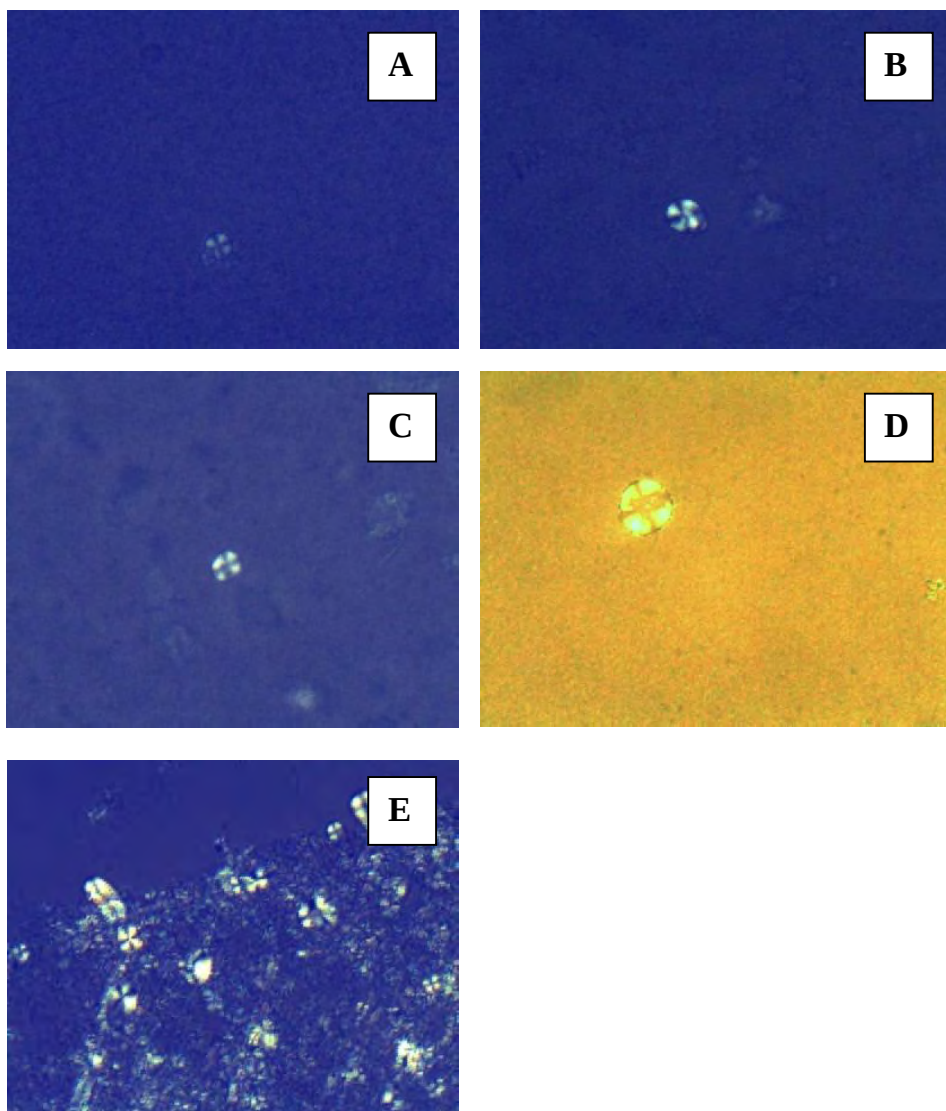


Figura 17: Fotomicrografia dos sistemas preparados com proporções crescentes de fase oleosa (A: 2%, B: 4%, C: 6%, D: 8% e E: 10%) e tensoativo constante (20%) na ausência de metiljasmonato.

Na figura 18 estão demonstradas as fotomicrografias dos sistemas contendo proporções crescentes de tensoativos e fase oleosa constante (6%) na ausência de MJ. É possível observar a presença de “cruzes de malta” nas imagens F, G e C características de estruturas de fase lamelar. Já nas imagens H e I não desviam o plano de luz polarizada, indicando sistemas isotrópicos.

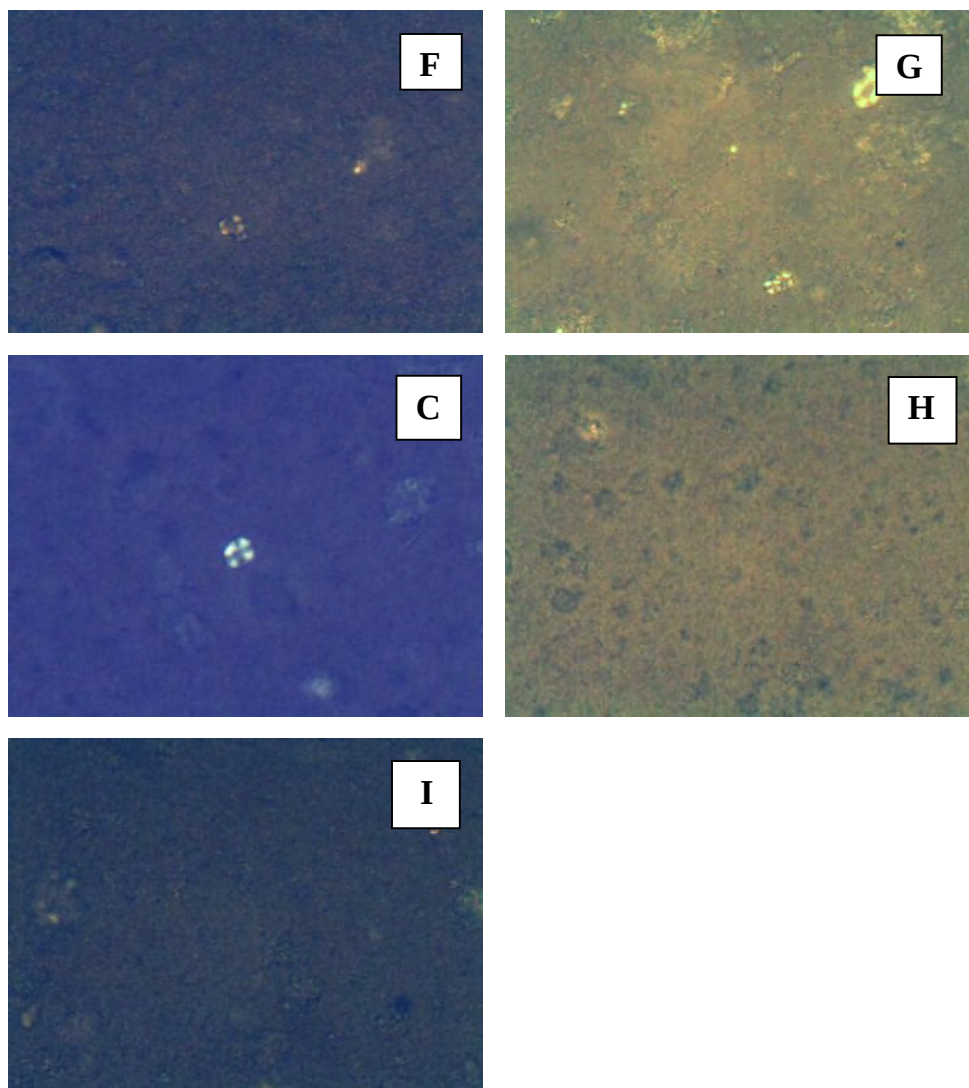


Figura 18: Fotomicrografia dos sistemas preparados com proporções crescentes de tensoativo (F: 16%, G: 18%, C: 20%, D: 22% e E: 24%) e fase oleosa constante (6%) na ausência de metiljasmonato.

Na figura 19 estão representadas as fotomicrografias dos sistemas estabilizados com 20% de tensoativos variando a proporção de fase oleosa na presença de MJ. Apenas as imagens C e D desviam o plano de luz polarizada, sendo, portanto, anisotrópicas com presença de cruzes de malta, sugerindo sistemas de estrutura de fase

lamelar. Já as imagens A, B e E não desviaram a luz sob o plano de luz polarizada demonstrando isotropia nessas amostras.

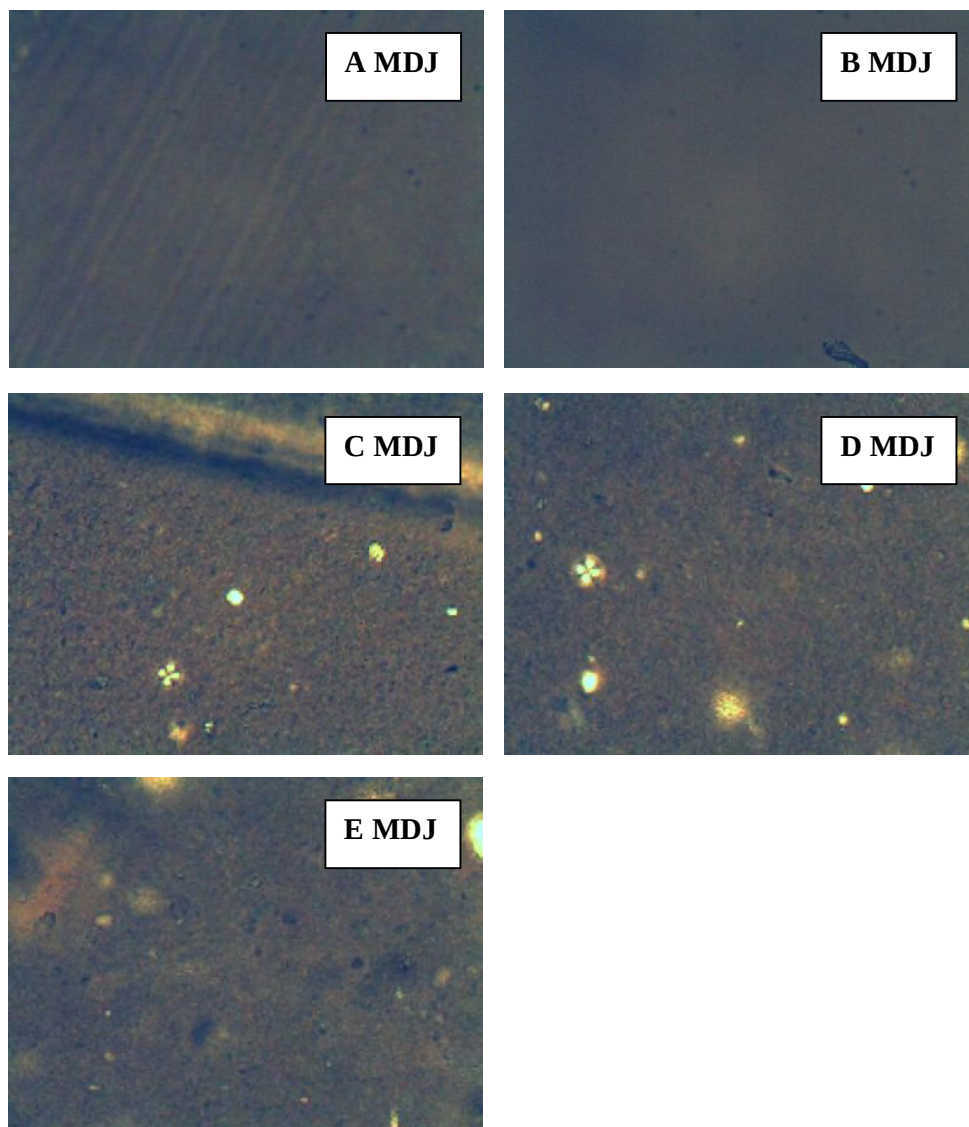


Figura 19: Fotomicrografia dos sistemas preparados com proporções crescentes de fase oleosa (A: 2%, B: 4%, C: 6%, D: 8% e E: 10%) e tensoativo constante (20%) na presença de metiljasmonato.

A figura 20 mostra as fotomicrografias dos sistemas com fase oleosa constante (6%) variando tensoativo na presença do fármaco. As fotomicrografias F, G, C e I

apresentaram cruzes de malta indicando sistemas de estrutura de fase lamelar enquanto a imagem H não desviou o plano de luz polarizada sendo, portanto um sistema isotrópico.

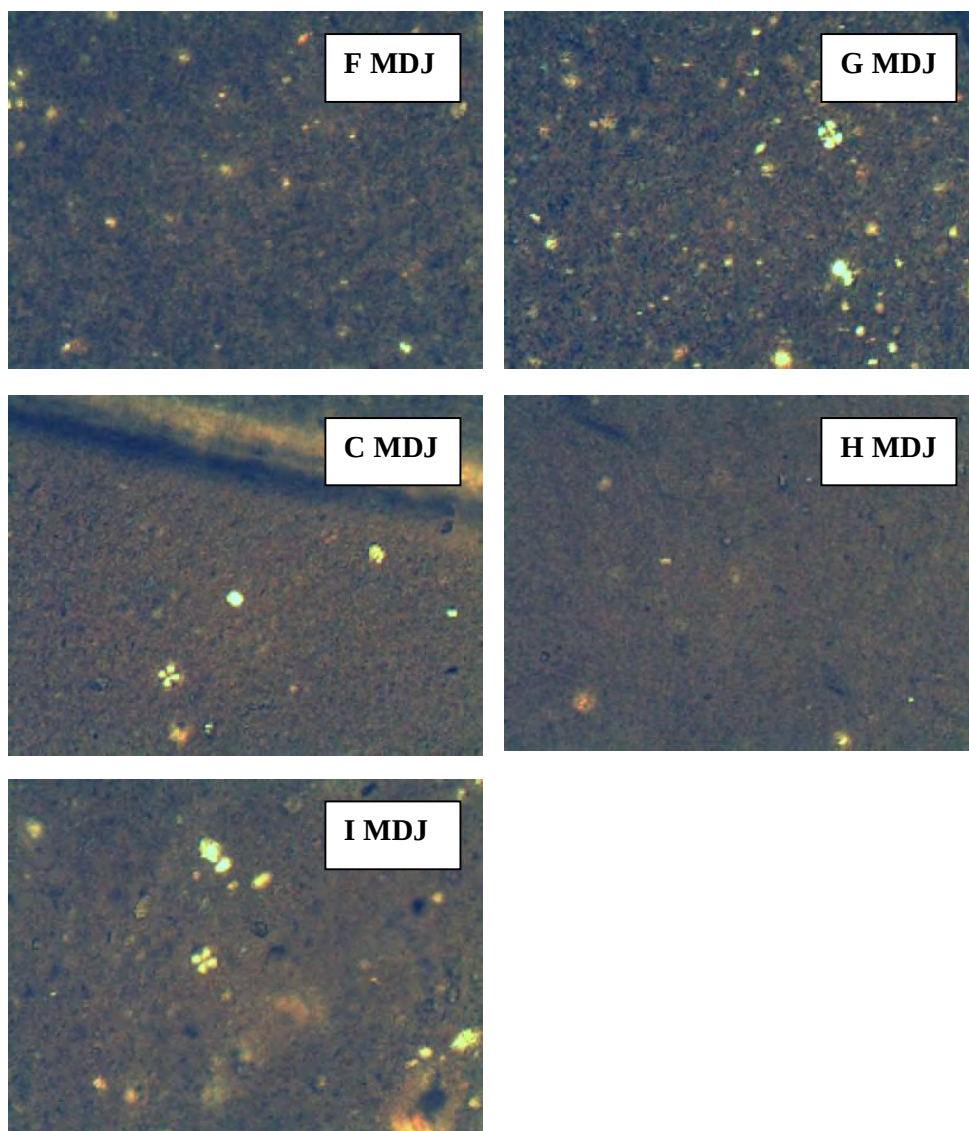


Figura 20: Fotomicrografia dos sistemas preparados com proporções crescentes de tensoativo (F: 16%, G: 18%, C: 20%, D: 22% e E: 24%) e fase oleosa constante (6%) na presença de metiljasmonato.

Na ausência de MJ: com o aumento da proporção de fase oleosa ocorreu aumento da organização estrutural do sistema. Esta maior organização está

acompanhada da diminuição do raio hidrodinâmico com o aumento da porcentagem de fase oleosa. Com o aumento da porcentagem de sistema tensoativo as formulações estudadas passaram a ser isotrópicas, diminuindo o grau de organização estrutural e aumentando o raio hidrodinâmico com o aumento da porcentagem de tensoativos.

Na presença de MJ: ocorreu aumento de isotropia principalmente nas formulações com variação de fase oleosa (A-E), acompanhada de diminuição do raio hidrodinâmico com a incorporação do fármaco.

Através da microscopia de luz polarizada foi observado que a maioria das formulações apresentou anisotropia enquanto através do diagrama de fases todas essas formulações são classificadas como microemulsões e deveriam, portanto apresentar isotropia.

Difração de Raios-X

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

$$2d \sin\theta = n\lambda,$$

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.

Os dados cristalográficos foram obtidos das amostras com e sem metiljasmonato e dos componentes: óleo de rícino polioxil-40-hidrogenado, fosfatidilcolina de soja, oleato de sódio e colesterol tendo como objetivo demonstrar se os sistemas são amorfos ou cristalinos de acordo com a incorporação do MJ, do aumento da proporção de colesterol ou do aumento da proporção de tensoativos.

Na figura 21 estão representados os difratogramas dos componentes utilizados nas ME deste trabalho. O colesterol apresentou um pico intenso e alongado confirmando a cristalinidade de sua estrutura. Os tensoativos: óleo de rícino, o oleato de sódio e a fosfatidilcolina de soja de acordo com os difratogramas apresentaram halos alargados e pouco intensos representando estruturas amorfas.

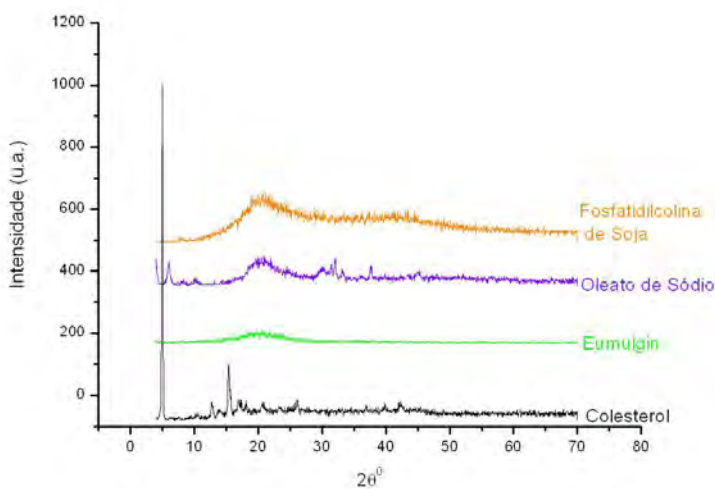


Figura 21: Difratogramas dos componentes: Óleo de Rícino Polioxil-40-Hidrogenado, Fosfatidilcolina de soja, Oleato de Sódio e Colesterol.

Na figura 22 estão representados os difratogramas das microemulsões A-E na ausência e presença do fármaco. Na ausência de MJ, independente da concentração de colesterol, todas as amostras apresentaram-se amorfas sempre com um halo alargado de baixa intensidade. Na presença de MJ, com o aumento da proporção de colesterol nota-se a presença de halos mais intensos e mais alargados. Embora as amostras continuem amorfas, isso indica que o aumento da proporção de colesterol em associação com o fármaco diminui a amorficidade destas formulações.

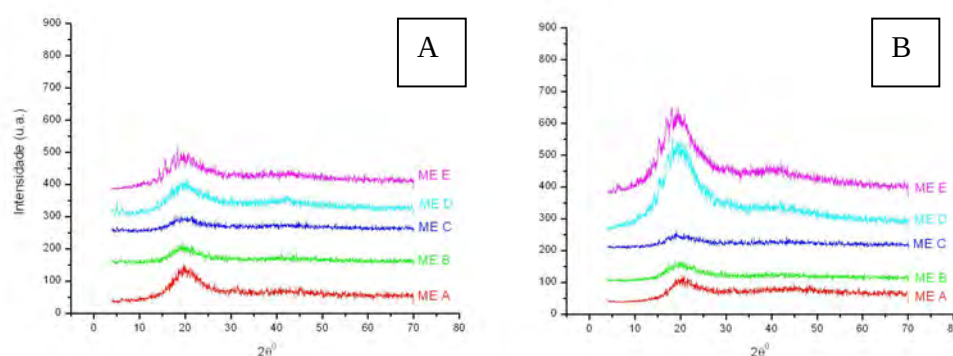


Figura 22: Evolução dos difratogramas dos sistemas preparados com proporções crescentes de fase oleosa (A: 2%, B: 4%, C: 6%, D: 8% e E: 10%) e tensoativo constante (20%) na ausência (A) e presença (B) de metiljasmonato.

Na figura 23 estão demonstrados os difratogramas das microemulsões F-I. Nas ME vazias as amostras apresentaram halos alargados e pouco intensos não ocorrendo modificação com o aumento da proporção de sistema tensoativo. Com a adição do MJ as amostras apresentaram picos mais intensos, mas ainda alargados, independente do aumento de sistema tensoativo. Estes picos mais intensos demonstram que a interação do fármaco na estrutura microemulsionada gera uma diminuição na amorficidade das microemulsões, porém todas as amostras continuam amorfas.

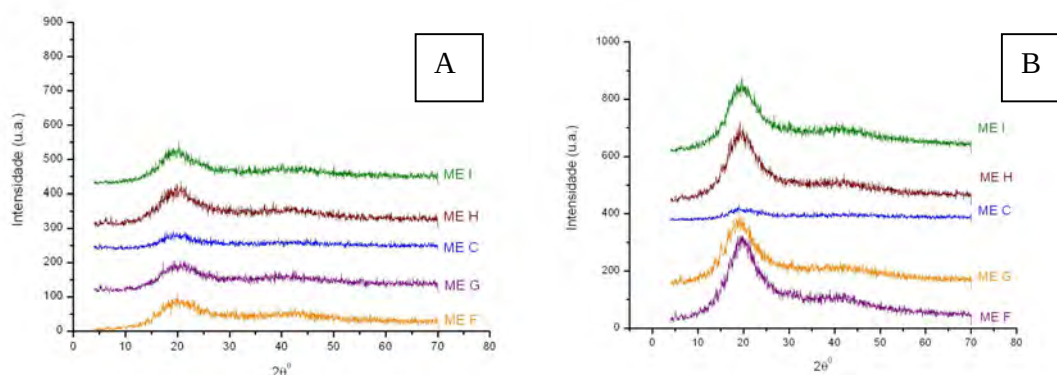


Figura 23: Evolução dos difratogramas dos sistemas preparados com proporções crescentes de tensoativo (F: 16%, G: 18%, C: 20%, H: 22% e I: 24%) e fase oleosa constante (6%) na ausência (A) e presença (B) de metiljasmonato.

Na figura 24 foram comparados difratogramas da microemulsão A com diferentes proporções de MJ (6 e 20%) devido a incapacidade de realizar a difração de raio-X em amostras líquidas e tendo em vista que o MJ apresenta-se sob a forma líquida, estas formulações com diferentes proporções de MJ foram utilizadas com a intenção de observar se o aumento do MJ nas ME tem algum efeito ou modificação em sua amorficidade. A microemulsão A (6% MJ) apresentou halo mais intenso que o da microemulsão A (20% MJ), isso indica que o aumento da porcentagem de MJ aumenta a amorficidade da ME, porém ambas as ME apresentaram estruturas amorfas.

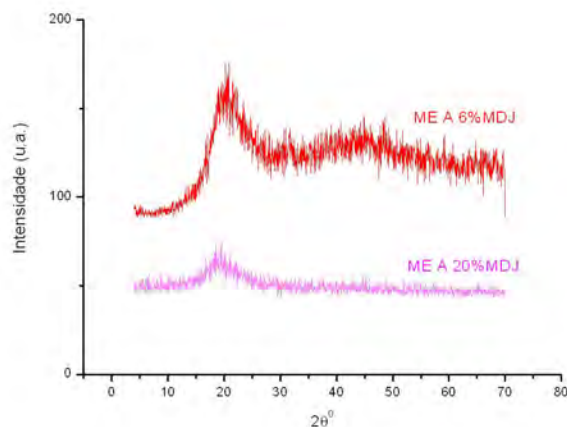


Figura 24: Evolução dos difratogramas da microemulsão A contendo 6% e 20% de MJ.

4.3. Determinação do MJ em formulações por cromatografia gasosa

Sistema Cromatográfico

O Cromatograma obtido do MJ em tampão Tris-HCl está representado na figura a seguir. As determinações foram feitas em triplicata por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG-EM).

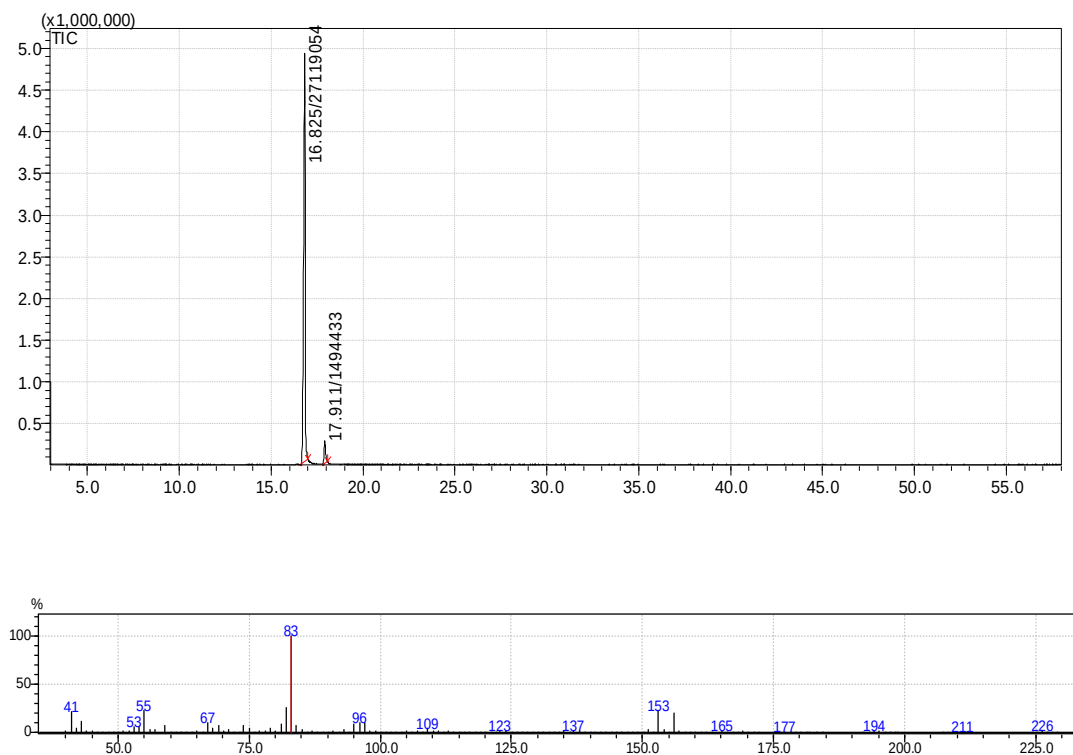


Figura 25: Cromatograma MJ 500ppm em tampão Tris-HCl contendo laurilsulfato de sódio a 0,15% e fragmentograma referente ao pico do MJ.

O MJ apresentou tempo de retenção em torno de 16,7 minutos em todas as amostras analisadas.

Curva analítica MJ em tampão

Foi construída uma curva analítica de MJ em tampão Tris-HCl 0,01M pH 7,2 contendo 0,15% laurilsulfato de sódio através de CG-EM, representado na figura 26 para posterior quantificação do MJ no meio receptor durante os ensaios de dissolução.

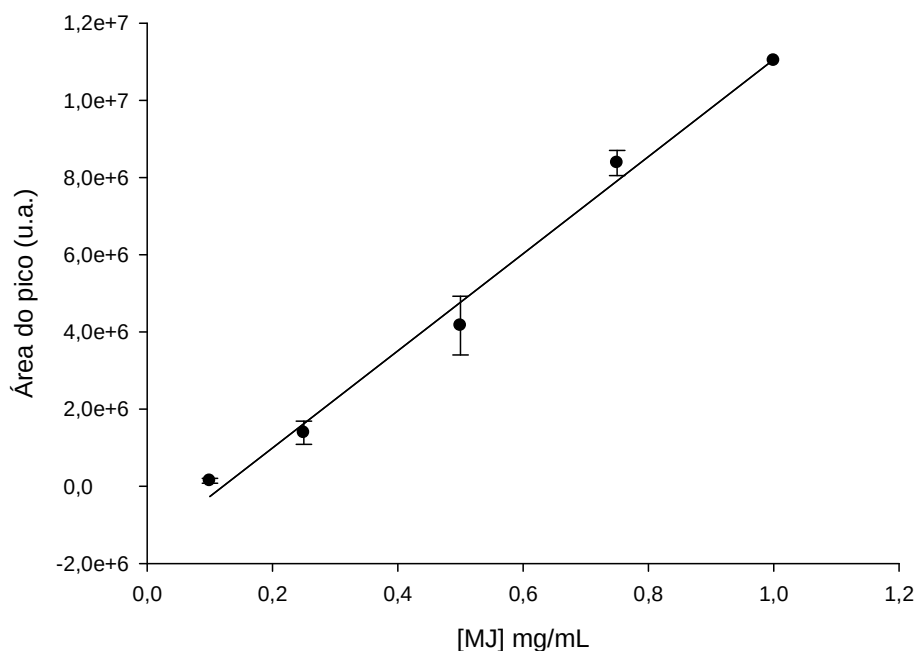


Figura 26: Curva analítica do MJ em tampão Tris-HCl contendo laurilsulfato de sódio a 0,15%, obtida por CG-EM.

A equação linear representativa obtida através da curva analítica de MJ em tampão Tris-HCl foi $y = 12575120,47x - 1519194,744$. O coeficiente de correlação foi de 0,990568206 demonstrando a linearidade do método.

4.4. Validação do método analítico

A validação do método foi garantida de acordo com as normas estabelecidas pela ANVISA (Resolução-RE nº899, 29 de maio de 2003), indicando que o método apresenta confiabilidade necessária para a liberação do MJ durante o teste de performance (liberação *in vitro*) classificado na categoria III que exige análise do parâmetro Precisão, além de outros parâmetros quando necessário.

Especificidade e Seletividade: nenhuma impureza ou componente das formulações foram detectados no tempo de retenção do MJ (em torno de 16,7 minutos), indicando seletividade e especificidade para o método. Através da espectometria de massas é possível comprovar que o pico cromatográfico é referente apenas ao metiljasmonato, sem interferência de outros componentes da formulação, como mostra o fragmentograma da figura 25, que apresentou um fragmento com m/z 226 u.m.a., que corresponde ao íon molecular do MJ.

Linearidade: A curva analítica apresentou coeficiente de correlação acima de 0,99 confirmando a linearidade do método.

Precisão Intra-corrida (Repetibilidade) e Inter-corrida (Intermediária): Os resultados obtidos nesta etapa estão representados na Tabela 6 e indicam precisão satisfatória, já que nos níveis de concentrações investigados os valores de coeficiente de variação são inferiores a 4%.

Tabela 6: Precisão intra-corrida e inter-corrida do método analítico do metiljasmonato em tampão.

Concentração	Intra-corrida n=3	Concentração	Inter-corrida n=3
(mg/mL)	Precisão (CV%)	(mg/mL)	Precisão (CV%)
2,5	0,7	0,75	3,7
25	0,5	5	2,1
100	2,7	50	0,2

CV = coeficiente de variação.

Os resultados obtidos da validação mostram que o método desenvolvido apresentou limite de confiança adequado para o ensaio de liberação *in vitro* do MJ nas diferentes formulações.

4.5. Incorporação do MJ nos sistemas microemulsionados

Escolha dos sistemas a serem estudados na incorporação e liberação *in vitro*

Os sistemas estudados na caracterização físico-química foram selecionados de acordo com os resultados obtidos: A, B, C, D (tensoativo fixo 20%) variando a proporção de fase oleosa e F, G, C e H (fase oleosa fixa 6%) com variação na proporção de sistema tensoativo, como demonstrado na Tabela 3. A formulação E foi descartada por apresentar alta viscosidade devido à alta concentração de colesterol (10%O) e a formulação I foi descartada pela alta concentração de tensoativos (24%).

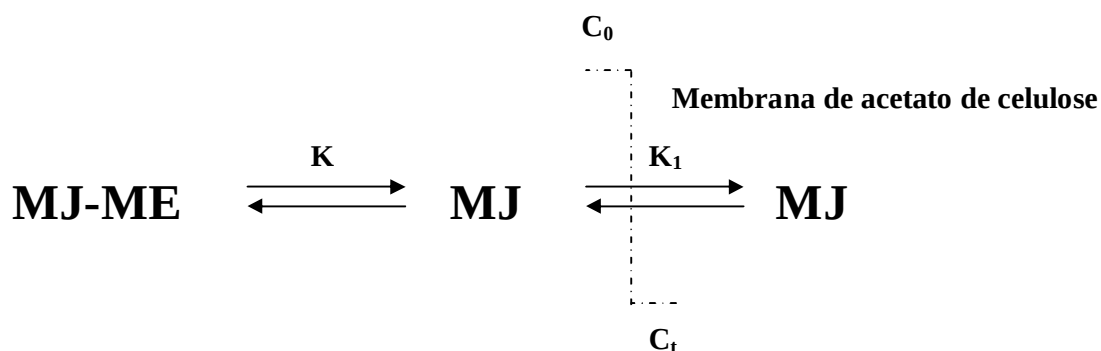
Incorporação

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, 200mg de MJ/g de ME.

4.6. Ensaio de liberação *in vitro*

O método utilizado para avaliar a liberação *in vitro* é o da difusão através da membrana. Neste ensaio inicialmente, o meio receptor está totalmente livre de fármaco. Ao iniciar o experimento o fármaco deve estar na fase oleosa interna das ME, ou seja, nas gotículas. Durante o ensaio, o fármaco deve ser liberado da fase oleosa interna para

a fase aquosa externa das ME (Esquema 1). Em seguida o fármaco será difundido através da membrana de acetato de celulose para o meio receptor, onde será coletado e quantificado. 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 não fosse influenciada pela baixa solubilidade do fármaco no meio receptor (PESTANA, 2009).



Esquema 1: No qual C_0 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.

Os perfis de liberação *in vitro* estão demonstrados nas figuras 27 a 29. Na figura 27 está representado o perfil de liberação do MJ em solução (não microemulsionada). Nas figuras 28 e 29 estão representados os perfis de liberação do MJ nas ME variando a proporção de fase oleosa e sistema tensoativo, respectivamente.

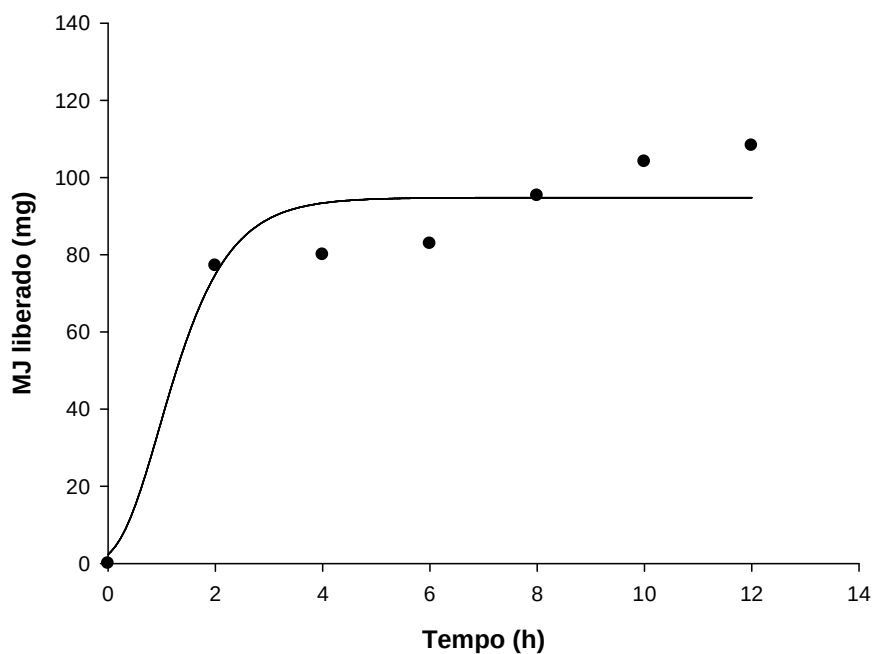


Figura 27: Perfil de Liberação *in vitro* do MJ livre em solução tampão Tris-HCl contendo de 0,15% de laurilsulfato de sódio (n=3).

Através da comparação da liberação da solução de MJ em tampão Tris-HCl 0,01M pH 7,2 (Figura 27) com as liberações dos sistemas microemulsionados (Figuras 28 e 29) fica evidente o efeito das ME em retardar a liberação do fármaco. Este efeito ocorre devido à associação do fármaco lipofílico com a fase interna da ME, o que gera a retenção do MJ nas gotículas devido a sua maior estabilidade termodinâmica na fase oleosa (FORMARIZ, 2004). Além da interação entre o fármaco e fase interna da ME, outro fator que também retarda a liberação do MJ no meio receptor, é que o processo de liberação deve ocorrer em duas etapas. A primeira envolve a saída do fármaco das gotículas para a fase externa da ME e a segunda envolve o processo de difusão do fármaco livre para o meio receptor, através da membrana de acetato de celulose.

A figura 28 mostra o efeito do aumento da porcentagem de fase oleosa na liberação *in vitro*.

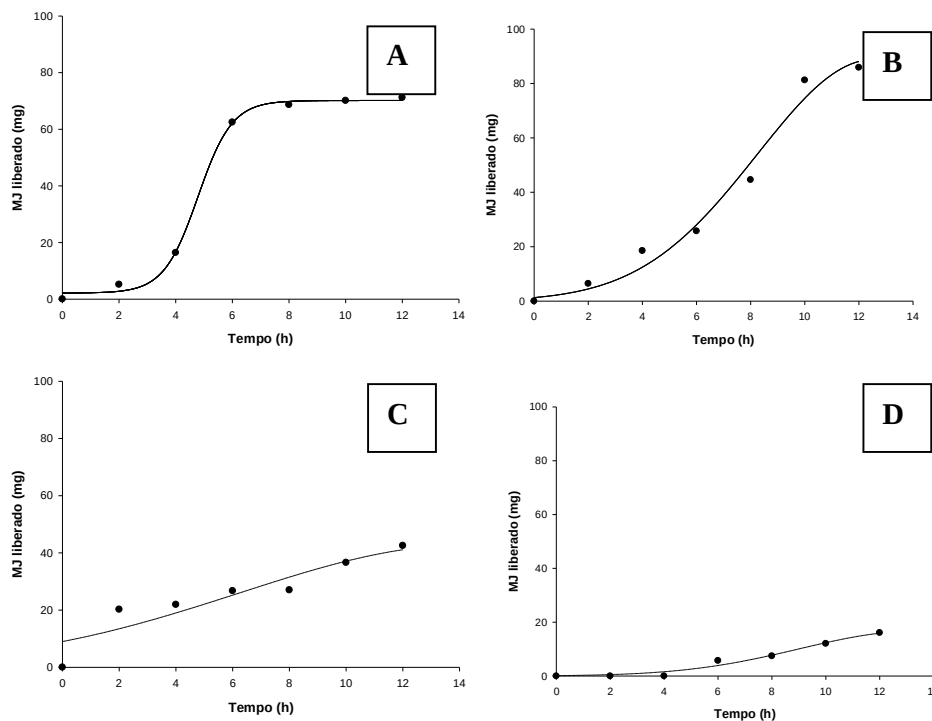


Figura 28: Perfil de liberação do MJ nos sistemas com proporções crescentes de fase oleosa: A: 2%, B: 4%, C: 6% e D: 8% e sistema tensoativo constante (20%).

Os resultados da figura 28 mostram que o aumento da porcentagem de colesterol (fase oleosa) dificulta a liberação do MJ do interior das gotículas de fase oleosa. Este fato pode ser explicado, pois o colesterol promove um empacotamento das moléculas de fosfolípido (fosfatidilcolina de soja) produzindo uma estrutura mais rígida e de menor mobilidade (FORMARIZ, 2004; TIROSH et al., 1997). Além disso, quanto maior a proporção de fase oleosa maior a proporção de MJ ligado a estas ME devido ao efeito hidrofóbico destes dois componentes, e esta interação hidrofóbica aumenta o efeito reservatório das ME, gerando uma liberação prolongada. Inicialmente as curvas apresentam um perfil sigmóide e com o aumento da porcentagem de fase oleosa esse perfil vai diminuindo de acordo com a menor liberação obtida. Essa diferença obtida no

perfil de cada formulação é algo de boa utilidade para o futuro, pois esses diferentes perfis de liberação podem significar distintos tratamentos em diferentes tipos de tumor. Por exemplo, tumores sólidos como de mama, de rim ou de próstata requerem um tratamento com formulação de liberação mais lenta, ou seja, de efeito mais prolongado como os perfis das formulações C e D, enquanto tumores não sólidos (como a leucemia) exigem tratamento mais rápido, com liberação menos lenta, de efeito mais rápido como os perfis de liberação das formulações A e B.

Na figura 29, estão os perfis de liberação do MJ em função do aumento da porcentagem de sistema tensoativo nas ME.

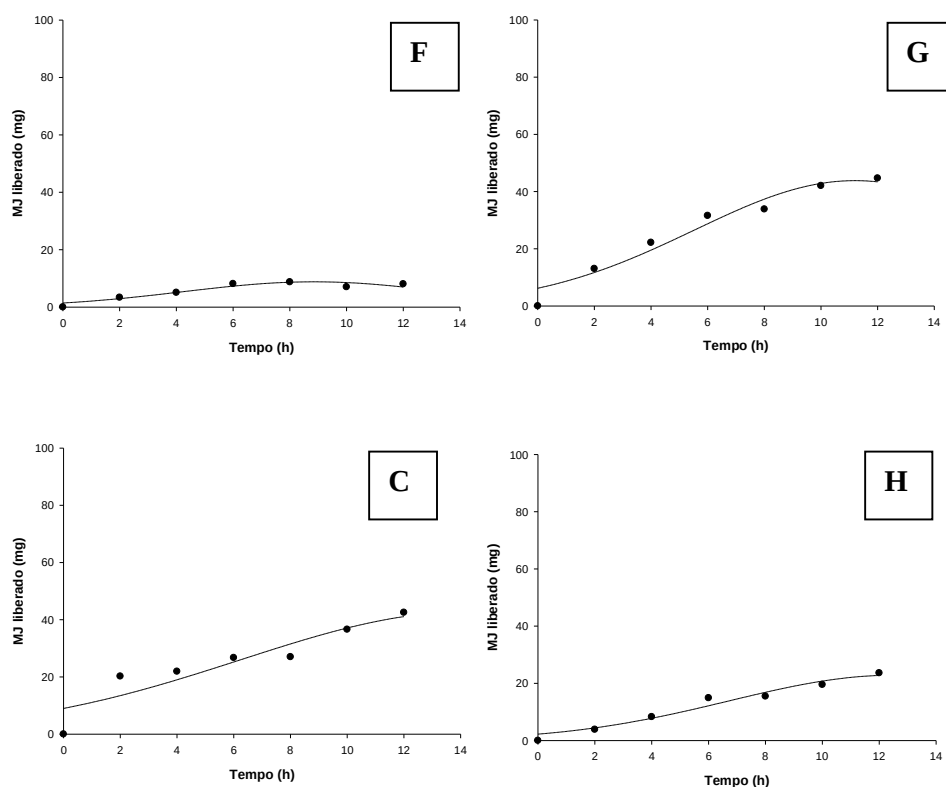


Figura 29: Perfil de liberação do MJ nos sistemas com proporções crescentes de sistema tensoativo: F: 16%, G: 18%, C: 20% e H: 22% e fase oleosa constante (6%).

Os resultados mostram que o aumento da porcentagem de sistema tensoativo diminuiu a liberação do fármaco. Apesar de a liberação do MJ da microemulsão G (18% tensoativos) ter sido maior que da microemulsão F (16%), a partir da microemulsão G a liberação volta a diminuir com o aumento subsequente da porcentagem de tensoativos.

Como a solubilização do MJ ocorre preferencialmente na fase oleosa, após sua incorporação o meio externo aquoso irá agir como uma barreira para o fármaco difundir-se novamente para fora das gotículas, o que facilita o transporte de fármacos pouco solúveis em água. Assim as ME funcionam como reservatório de fármaco, permitindo uma liberação lenta e proporcionando assim um efeito prolongado (OLIVEIRA et al., 2004; GRASSI, 2006).

4.7. Avaliação da atividade antiproliferativa *in vitro*

Escolha do sistema a ser estudado na avaliação *in vitro* e toxicidade aguda

O sistema escolhido para esta etapa do estudo foi aquele composto por 2% de fase oleosa, 20% de sistema tensoativo e 78% de fase aquosa; amostra A (Tabela 3). Este sistema apresentou características físico-químicas de ME, maior transparência e baixa viscosidade quando comparado com as outras amostras avaliadas. No ensaio de liberação a amostra A teve uma das maiores liberações de MJ quando comparado com as outras ME no mesmo intervalo de tempo.

Atividade antiproliferativa da microemulsão contendo MJ

As figuras a seguir mostram o perfil de quimiossensibilidade das linhagens celulares a doxorubicina liofilizada (Adriblastina RD, Pharmacia) como controle

positivo, microemulsão vazia como branco do sistema, MJ livre e microemulsão contendo 200 mg/g de MJ incorporado. As amostras foram analisadas em triplicata.

A doxorrubicina submetida ao ensaio antiproliferativo *in vitro* utilizada como controle positivo (Figura 30) inibiu as linhagens celulares de forma concentração dependente promovendo um efeito citostático e citocida para as linhagens de melanoma (UACC 62), mama (MCF 7 e NCIADR), próstata (PC O3), rim (786-0), apenas efeito citocida para linhagem de pulmão (NCI-460) e efeito citostático para as outras linhagens: ovário (OVCAR03), leucemia (K562) e cólon (HT-29).

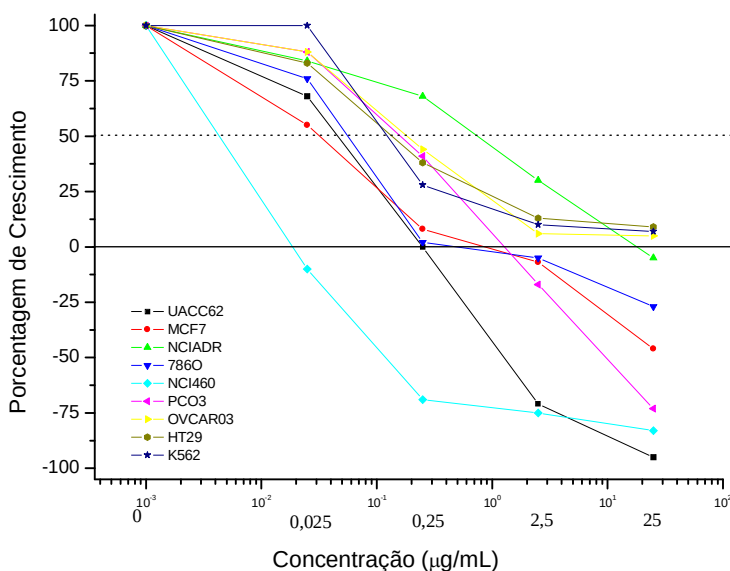


Figura 30: Atividade antiproliferativa do Cloridrato de Doxorrubicina liofilizado (Adriblastina[®] RD, Pharmacia), utilizado como controle positivo (n=3).

O sistema microemulsionado utilizado como branco do sistema (Figura 31) apresentou atividade antiproliferativa de maneira concentração dependente e com efeito citostático para linhagem celular de pulmão (NCI-460) nas maiores concentrações. Todas as outras linhagens celulares não apresentaram inibição proliferativa indicando

que os componentes utilizados nesta ME e suas porcentagens não são capazes de inibir a proliferação das células (atividade citostática) ou causar morte celular (atividade citocida), demonstrando que o sistema não é tóxico em relação às linhagens celulares. A atividade citostática para linhagem NCI-460 apesar de pequena não era esperada, porém algum componente da ME deve ter exercido efeito antineoplásico.

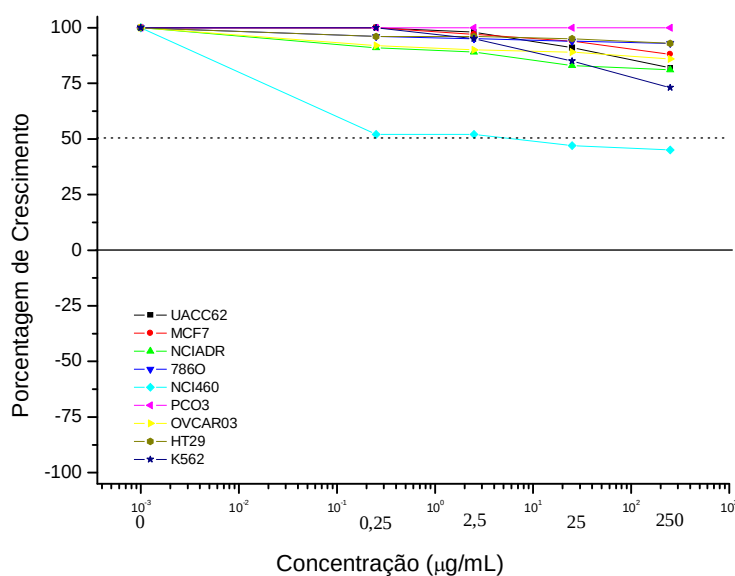


Figura 31: Atividade antiproliferativa da Microemulsão vazia, estabilizada com 20% de tensoativos contendo 2% de fase oleosa e 78% de fase aquosa, utilizada como branco do sistema (n=3).

O MJ livre (Figura 32) inibiu as linhagens celulares de maneira suficiente para obter o efeito antiproliferativo de maneira concentração dependente com efeito citostático e citocida para as linhagens de pulmão (NCI-460), efeito citocida para as linhagens de mama (NCIADR), próstata (PC O3), melanoma (UACC 62) e ovário

(OVCAR03) e com efeito citostático para as outras linhagens: leucemia (K562) e cólon (HT-29), mama (MCF 7) e rim (786-0).

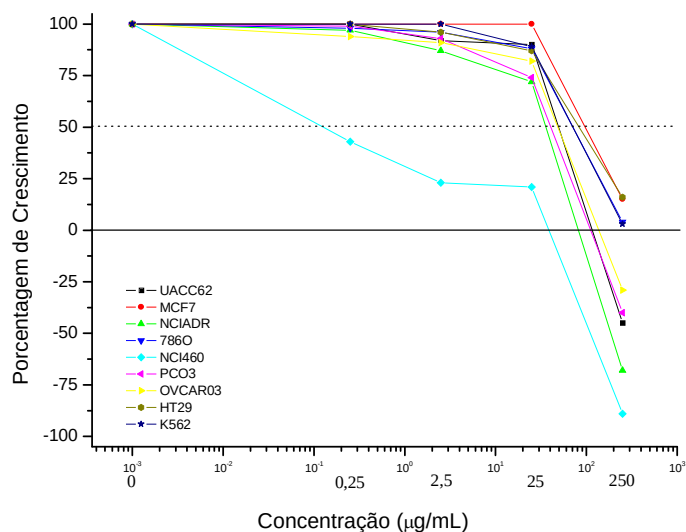


Figura 32: Atividade antiproliferativa do MJ livre (n=3).

A microemulsão contendo 200 mg/g de MJ (Figura 33) inibiu as linhagens celulares de leucemia e pulmão de maneira suficiente para obter o efeito antiproliferativo de maneira concentração dependente, linhagem não seletiva e com efeito citostático.

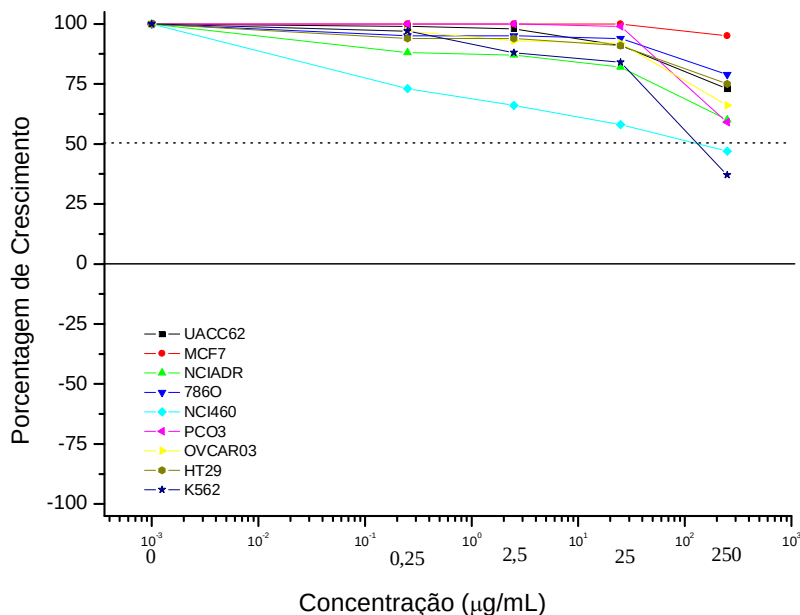


Figura 33: Atividade antiproliferativa da microemulsão estabilizada com 20% de FS/ORPH/OS, contendo 2% de colesterol como fase oleosa, 78% de fase aquosa e 200 mg/g MJ (n=3).

O sistema microemulsionado contendo MJ apresentou atividade antiproliferativa menor que quando comparado ao MJ livre, isto era esperado já que esses sistemas funcionam como sistemas reservatórios de fármacos proporcionando uma liberação lenta de efeito prolongado, ou seja, em 48h de experimento o MJ não deve ter sido liberado das gotículas de maneira suficiente para obter atividade antiproliferativa maior ou nas outras linhagens celulares.

4.8. Avaliação da Toxicidade Aguda

A avaliação da toxicidade aguda é a etapa inicial para avaliar o perfil toxicológico de uma substância, podendo sugerir o mecanismo de toxicidade envolvido na absorção da mesma por diferentes vias de administração ou fornecer informações sobre o risco à saúde humana capaz de advir da administração aguda dessa substância (BIGHETTI *et al.*, 2004).

A Dose Letal 50% (DL50) é a dose única que causa a morte em 50% dos animais, sendo expressa em peso da substância teste por unidade de peso do animal experimental (mg/kg). O valor da DL50 é calculado por meio da observação e quantificação do número de mortes após a administração única de uma substância ou produto químico por diferentes vias de administração, em ratos ou camundongos (BIGHETTI *et al.*, 2004).

Os resultados obtidos na avaliação da toxicidade aguda do MJ livre e do MJ-ME estão descritos nas Tabelas 7 e 8.

Tabela 7: Mortalidade dos camundongos Swiss que receberam metiljasmonato.

Dose (mg/kg)	Número de animais testados por grupo	Número de animais mortos	Mortalidade (%)
70	5	0	0
140	5	0	0
280	5	0	0
350	5	0	0

Os camundongos que receberam MJ livre e MJ-ME não apresentaram sinais de toxicidade aguda e nem morte durante os 14 dias de observação. Como não ocorreram

mortes não foi possível calcular a dose letal média do MJ ou MJ-ME. Após administração intraperitoneal do MJ e MJ-ME foi possível observar que os camundongos ficaram sonolentos recuperando-se horas depois.

Tabela 8: Mortalidade dos camundongos Swiss que receberam as microemulsões contendo metiljasmonato.

Dose (mg/kg)	Número de animais testados por grupo	Número de animais mortos	Mortalidade (%)
70	5	0	0
140	5	0	0
280	5	0	0
350	5	0	0

A menor dose testada foi de 70 mg/kg tanto de MJ livre quanto de MJ-ME. Esta dose é letal para ratos e camundongos, quando se trata da doxorubicina livre ou incorporada à microemulsões (FORMARIZ, 2008). Este fato mostra que o MJ não apresenta toxicidade, tendo em vista que na concentração de 350 mg/kg, dose cinco vezes maior que a letal para doxorubicina, não ocorreram sinais de toxicidade ou morte dos camundongos.

5. CONCLUSÕES

- Foi possível obter microemulsões O/A utilizando o sistema tensoativo: FS/ORPH/OS, nas proporções 7:7:3, tampão Tris HCl 0,01M pH7,2 como fase aquosa e Colesterol como fase oleosa.
- O raio hidrodinâmico diminui com o aumento de fase oleosa no sistema, na presença e ausência de metiljasmonato.
- O raio hidrodinâmico aumenta com o aumento da proporção de sistema tensoativos, na ausência de metiljasmonato e sofre diminuição na presença do fármaco.
- O raio hidrodinâmico diminui com a incorporação de metiljasmonato ao sistema.
- Todas as microemulsões estudadas comportaram-se como fluídos pseudoplásticos, exibindo comportamento tixotrópico na ausência do metiljasmonato e anti-tixotrópico na presença deste.
- A organização estrutural do sistema depende da proporção de fase oleosa, de tensoativos e da incorporação do metiljasmonato.
- Todas as microemulsões estudadas apresentaram estrutura amorfa.
- As microemulsões estudadas comportaram-se como sistemas reservatórios *in vitro*, retardando a liberação do fármaco, sendo a velocidade de liberação do metiljasmonato dependente da proporção de fase oleosa e de sistema tensoativo.
- As microemulsões vazias não são tóxicas para as linhagens celulares utilizadas.
- A microemulsão utilizada no estudo da atividade antiproliferativa inibiu as linhagens celulares de leucemia e pulmão de maneira suficiente para obter o efeito antiproliferativo de maneira concentração dependente, linhagem não seletiva com efeito citostático, porém este efeito foi menor que quando comparado com metiljasmonato livre.

- O metiljasmonato livre e o metiljasmonato incorporado à microemulsão não apresentaram toxicidade nas doses testadas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABOOFAZELI, R.; BARLOW, D.; LAWRENCE, M.J., Particle size analysis of concentrated Phospholipid microemulsions II. Photon correlation spectroscopy. *APPS PharmSci.*, 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 11 abr. 2010.

BIGHETTI, A.E.; ANTONIO, M.A.; POSSENTI, A.; FOGLIO, M.A.; SIQUEIRA, M.G.; CARVALHO, J.E. Efeitos da administração aguda e subcrônica da *Luehea divaricata Martus et Zuccarin.*, *Lec.*, v.22, p.53-58, 2004.

BRASIL - MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2007. [Online] Disponível em: <http://www.portal.saude.gov.br/noticias>. Acesso em 20 de abril de 2010.

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.

BROWN, C.K.; CHOKSHI, H.P.; NICKERSON, B.; REED, R.A.; ROHRS, B.R.; SHAH, P.A. Acceptable analytical practices for dissolution testing of poorly soluble compounds. *Pharm. Technol.*, p.56-65, 2004.

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.

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.

CORREA, M.A. *Incorporação de naproxeno em sistema microemulsionado: liberação in vitro e avaliação biológica*. São Paulo, 1996. Tese (Doutorado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 1996.

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 and surfaces*. v. 43, p. 108-114, 2005.

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.

DIAS, M.L.N.; CARVALHO, J.P.; RODRIGUES, D.G.; MARANHÃO, R.C. Pharmacokinetics and tumor uptake of a derivatized form of paclitaxel associated to a cholesterol-rich nanoemulsion (LDE) in patients with gynecologic cancers. *Canc. Chem. Pharmacol.*, v.59, p.105-111, 2007.

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 Letters*, v. 270, p. 277-285, 2008.

FANKHAUSER, F. 2nd. Application of static and dynamic light scattering-a review. *Klin Monbl Augenheilkd.*, v. 227, p. 194-198, 2010.

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 25 de dezembro de 2010.

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.

FAVERO, G.M.; BYDLOWSKI, S.P. LDL RECEPTORS: ANTINEOPLASIC DRUG TARGET. *Biol. Health Sci.*, v.14, p. 53-58, 2008.

FLESCHER, E. Jasmonates in cancer therapy. *Cancer letters*, 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.; SCARPA, M.V.; SILVA-JUNIOR, A.A.; EGITO, E.S.T.; TERRUGI, C.H.B.; FRANZINI, C.M.; SARMENTO, V.H.V.; OLIVEIRA, A.G. Structure and viscoelastic behavior of pharmaceutical biocompatible anionic microemulsions containing the antitumoral drug compound doxorubicin. *Colloids Surf. B.*, v.77, p.47-53, 2010.

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.; 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.; A.A. SILVA-JÚNIOR; GREMIÃO, M.D.; OLIVEIRA, A.G. Microemulsões e fases líquidas cristalinas como sistemas de liberação de fármacos. *Rev. Bras. Ciên. Farmac.*, v.41, n. 3, 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.

FORMARIZ, T.P. *Incorporação de doxorubicina em microemulsões estabilizadas por fosfatidilcolina de soja e estudo da atividade antiproliferativa in vitro através de cultura de células*. 199f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2004.

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

GARTI, N.; ASERIN, A. Pharmaceutical emulsions, double emulsion and microemulsion. In *Drugs and the pharmaceutical sciences*. New York: Marcel Dekker, 1996. v. 73, cap. 15, p.412-519.

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

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.

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.

HE, J.; NIE, A.; HE, X.; YU, Z.; YE, X.; XING, Q. Mass spectrometric study of six cyclic esters. *Rapid Commun Mass Spectrom.*, vol. 14, p.765–771, 2000.

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

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.

HO, Y.K.; SMITH, R.G.; BROWN, M.S.; GOLDSTEIN, J.L. Low-density lipoprotein (LDL) receptor activity in human acute myelogenous leukemia cells. *Blood*, v.52, p. 1099-1104, 1978.

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 Letters*, v. 271, p.34-46, 2008.

LACHMAN, L.; LIBERMAN, H.; KANIG, L.J. *Teoria e Prática na indústria farmacêutica*. 3rd ed. Philadelphia: Lea & Febiger, p.1143, 2001.

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

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.

MELO, M.E.B. *Avaliação do potencial genotóxico de fármacos com ação antiparasitária através de testes de mutagenicidade em bactérias e clastogenicidade em células de mamíferos*. São Paulo, 1996, 145p. Dissertação (Mestrado) – Instituto Oswaldo Cruz, São Paulo, 1996.

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.

NEEDLEMAN, P.; TURK, J.; JAKSCHIK, B.A.; MORRISON, A.R.; LEFKOWITH, J.B. Arachidonic acid metabolism. *Ann. Rev. 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 and Surfaces*. 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 cephaclor. *J. Pharm. Sci.*, v. 86, p.616-620, 1997.

PARK, M.K.; KIM, K.C. Preparation and evaluation of flubiprofen-loaded microemulsion for parenteral delivery. *Int. J. Pharm.*, v.181, p.173-179, 1999.

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*. 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.

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.

SIGMA ALDRICH-CO, [Online] Disponível em: www.sigmaaldrich.com. Acesso em 21 de dezembro de 2010.

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

SIROTTI, C.; COCEANI, N.; COLOMBO, I.; LAPASIN, R.; GRAS, M. Modeling of drug release from microemulsions: a peculiar case. *J. Membrana Sci.*, v. 204, p. 401-412, 2002.

SOUSA, M.R. Q. *Estudo dos efeitos da lapachona sobre células da linhagem Hep-2, carcinoma de Ehrlich e sarcoma-180*. Recife, Pernambuco, 2000, 95p. Tese de Doutorado – Universidade Federal de Pernambuco, UFPE, Recife, 2000.

TIROSH, O.; KOHEN, R.; KATZHENDLER, J.; ALON, A.; BARENHOLZ, Y. Oxidative stress effect on the integrity of lipid bilayers is modulated by cholesterol level of bilayers. *Chem. Phys. Lipids*, Shannoon, v.87, p.17-22, 1997.

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

TROTTA, M. Influence of phase transformation on indomethacin release from microemulsions. *J. Control. Rel.*, v.60, p.399-405, 1999.

TROTTA, M.; PATTARINO, F.; IGNONO, T. Stability of Drug carrier emulsions containing phosphatidylcholine mixtures. *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, v.53, p. 203-208, 2002.

ULLMAN-CULLERE, M.H.; FOLTZ, C.J. Body condition scoring: a rapid and accurate method for assessing health status in mice. *Laboratory Animal Science*, v.49, n.3, p. 319-323, 1999.

VAN BERKEL, T. J.; [ZIERE, G.J.](#); [BIJSTERBOSCH, M.K.](#); [KUIPER, J.](#) Lipoprotein receptors and atherogenic receptor-mediated mechanisms. *Curr.Opin.Lipidol.*, v.5, p.331-338, 1994.

VICENT, P.C.; NICHOLLS, A. Comparison of the growth of the ehrlich ascites tumor in male and female mice. *Cancer research*, n. 27, p. 1058-1065, 1967.

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.

WOLFENDER, J.L.; MAILLARD, M.; HOSTETTMANN, K. Thermospray liquid chromatography-mass spectrometry in phytochemical analysis. *Phytochem. Anal.*, vol. 5, p.153-182, 1994.

WOOD, J.H. Reologia Farmaceutica. 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.; ELEGBEDE 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*, v.19, p.766-776, 2008.

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