

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
CÂMPUS DE ARARAQUARA

FORMULAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA E
BIOFARMACÊUTICA DE MICROEMULSÕES LIPÍDICAS
CONTENDO DOXORRUBICINA

THALITA PEDRONI FORMARIZ

ORIENTADOR: Prof. Dr. ANSELMO GOMES DE OLIVEIRA
CO-ORIENTADORA: Profa. Dra. ROSÂNGELA G. PECCININI

ARARAQUARA – SP

2008

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
CÂMPUS DE ARARAQUARA

FORMULAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA E
BIOFARMACÊUTICA DE MICROEMULSÕES LIPÍDICAS
CONTENDO DOXORRUBICINA

THALITA PEDRONI FORMARIZ

Tese apresentada ao programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Área de Pesquisa e Desenvolvimento de Fármacos e Medicamentos, da Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, como parte dos requisitos para a obtenção do Título de Doutor em Ciências Farmacêuticas.

ORIENTADOR: Prof. Dr. ANSELMO GOMES DE OLIVEIRA

CO-ORIENTADORA: Profa. Dra. ROSÂNGELA G. PECCININI

ARARAQUARA – SP

2008

Ficha Catalográfica

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

F724f Formariz, Thalita Pedroni
Formulação e caracterização físico-química e biofarmacêutica de
microemulsões lipídicas contendo doxorubicina / Thalita Pedroni Formariz.
– Araraquara, 2008.
203 f.

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

Orientador: Anselmo Gomes de Oliveira

Co-orientadora: Rosângela G. Peccinini

1.Doxorubicina. 2.Microemulsão lipídica. 3.Colesterol. 4.Atividade
antitumoral. 5.Liberação prolongada.. I.Oliveira, Anselmo Gomes, orient..
II. Peccinini, Rosangela Gonçalves, co-orientador. III.Título.

CDD 615.19

Candidato(a): Thalita Pedroni Formariz

Título da Tese:

Formulação e caracterização físico-química e biofarmacêutica de em microemulsões lipídicas contendo doxorrubicina.

A Comissão Julgadora dos trabalhos de defesa da Tese de Doutorado, em sessão pública realizada em 01/08/2008, consideraram o candidato(a):

REPROVADO

APROVADO

- 1) Examinadora *Profa. Dra. Maria Vitória Lopes Badra Bentley*
- 2) Examinadora *Profa. Dra. Renata Fonseca Vianna Lopez*
- 3) Examinadora *Profa. Dra. Maria Palmira Daflon Gremião*
- 4) Examinador *Prof. Dr. Victor Hugo Vitorino Sarmiento*
- 5) Presidente *Prof. Dr. Anselmo Gomes de Oliveira*

“Deus nos dá as tintas.

Mas nós que pintamos a tela, o quadro da vida.

Que bom seria se conseguíssemos colorir e recriar o mundo,

trazendo o eterno para dentro do tempo,

repintando de azul celeste e verde-esperança as paisagens áridas do cotidiano sem

horizontes, neste século desumanizado, agressivo e opressor.

Definitivamente, o amor e a esperança são os dois melhores pincéis do mundo.

Sem eles a aquarela da vida se transforma num imenso borrão de machucar os olhos

e doer no coração.”

Maria Therezinha Formariz Pelizzari

(09/11/1937-11/07/2004)

Aos meus pais Francisco e Penha

“Papai e mamãe primeiro, vocês me deram a vida, acompanharam meus primeiros passos, me ensinaram as primeiras palavras e investiram para que herdasse o maior dos tesouros: o Conhecimento. O amor os levou a correr todos os riscos do mundo por minha causa. Vocês não deram tudo o que queriam para mim e para Thaisinha, mas deram tudo o que tinham. Vocês deixaram os seus sonhos para que nós pudéssemos sonhar. Deixaram seu lazer para que nós tivéssemos alegrias. Perderam noites de sono para que nós dormíssemos tranqüilas. Derramaram lágrimas para que nós fossemos felizes. Perdoem-me pelas falhas e principalmente pelas vezes que não reconheci seu imenso valor. Minha dívida é impagável. Hoje, já posso andar com minhas próprias pernas, mas sempre, nas vitórias e naqueles momentos onde tudo parece perdido, seu colo irei procurar e voltarei a ser simplesmente Filha. E, como prova de minha eterna gratidão, dedico esta Tese e esta vitória especialmente a vocês.

Papai, Mamãe.....amo vocês.”

AGRADECIMENTOS

A *Deus*, primeiramente, por estar sempre comigo, me ajudando e dando forças em todos os dias de minha vida.

“Deus sabe ... Quando estou cansada e desencorajada por esforços que não deram frutos. Deus sabe quando tentei... Quando chorei por longo tempo com o coração cheio de angústia. Ele contou minhas lágrimas. Quando sinto que a vida está perdida e que muito tempo se perdeu Ele me conforta... Quando estou solitária e meus amigos estão muito ocupados para um simples telefonema Ele me acompanha... Quando sinto que já tentei de tudo e não sei por onde remeçar Ele tem a solução... Quando nada mais faz sentido e sinto frustrada e deprimida Ele tenta me mostrar respostas... Quando tudo parece mais brilhante e percebo uma luz de esperança, nesse momento Ele soprou nos meus ouvidos. Quando as coisas vão bem e tenho muito para agradecer Ele está festejando comigo... Quando algo me traz muita alegria e me sinto fortalecida Ele está sorrindo para mim... Quando tenho um propósito a cumprir e um sonho para seguir Ele abre meus olhos e me chama pelo nome... Onde eu estiver seja na alegria e na tristeza, mesmo que ninguém mais saiba, DEUS sabe....”

Ao querido orientador e amigo, *Prof. Dr. Anselmo Gomes de Oliveira*, uma pessoa especial, exemplo de sabedoria, que tão bem soube transmitir seus ensinamentos, confiança, dedicação e amizade, o meu mais sincero agradecimento.

“A verdadeira vida não é constituída de currículos, homenagens ou mesmo conquistas que aumentam o nosso intelecto; mas sim de essência humana. A maior mensagem que posso deixar cravada na minha vida é a maneira pela qual vou vive-la. Minha vida será a sua homenagem.” Minha eterna gratidão!

A querida co-orientadora e amiga *Prof^{ta}. Dra. Rosângela Gonçalves Peccinini* por estar ao meu lado, de forma surpreendente, nos momentos mais importantes, que me marcaram, transformaram, comoveram. Agradeço pela amizade, apoio e dedicação imensuráveis e por me ensinar, muitas vezes como crescer.

“Há pessoas que nos falam e nem escutamos; há pessoas que nos ferem e nem cicatrizes deixam.

Mas, há pessoas que, simplesmente aparecem em nossa vida e marcam para sempre...” (Cecília Meireles)

A minha irmã *Thaisinha*, aos meus avós *Euvira, Santos (in memorian)* e *Mercedes (in memorian)* pelo enorme laço de amor e carinho que nos une. Vocês são muito especiais para mim. Amo vocês!!!

“Deus me deu vocês para que eu me enxergasse, para manter-me forte e ajudar-me a tocar em frente. Deus me deu vocês para partilhar meu coração e minha alma, para me trazer coragem e esperança, para ensinar-me o significado do Amor Incondicional. Deus me deu vocês para aceitar-me como sou; para entender minhas dificuldades, para que assim, eu tivesse amigos de verdade. Deus me deu vocês para me trazer lições, ajudarem-me a crescer e fortalecer meu espírito. Deus me deu vocês para dar-me esperanças, clarear meus pensamentos e encorajar meus sonhos. Deus me deu vocês para me inspirar a ser a melhor do que eu possa ser; para mostrar-me a importância da verdade e da alegria.”

Ao meu noivo *Fabio Henrique Pilon* pelo amor, carinho e dedicação nas horas difíceis, mas também naquelas felizes! Obrigada por inspirar-me. Por revitalizar minha imaginação e ajudar-me a abrir caminho para ela. Obrigada por confiar na viabilidade do

possível. Obrigada por estar sempre ao meu lado, pois sozinha eu não teria a coragem de começar nem a persistência de chegar ao fim. Obrigada por aceitar, voluntariamente, os riscos deste desafio!

“A você que esteve comigo todo esse tempo, que sofreu comigo a cada adeus e escutou as histórias mais mirabolantes da minha fase de deslumbramento, ficará eternamente em meus pensamentos e coração. A você, meu amor, que soube suportar com firmeza o tempo e a distância, constituindo um modelo de dedicação e fidelidade. A você que, em cada despedida, deixava transparecer nos olhos a tristeza, apesar dos lábios tentarem esboçar um sorriso consolador, devo a alegria deste momento. Agradeço pelos votos de confiança em mim depositados, que me fizeram crescer e não desistir no meio do caminho.” Amo você!!!

A Maria e a minha família (Pedroni, Usson e Formariz) em especial ao tio Ari, Helton, Higor, aos meus padrinhos Regina e Alceu, Natália, Larissa, Marli, Sérgio, Alex, André, Robson, Oriana, Tales, Júlia, tia Tê (in memorian) e família, tio Zito e família, tio Luizinho e família, tia Marina e família, tia Nanci e família, tia Zezé Formariz e família, tio Dito e família e tio Ciro e família. Obrigado, pelo apoio sempre presente que me transformou em gigante, capaz de lutar e ir adiante, apesar das dificuldades, buscando sempre a conquista de meus ideais. Ah, se eu pudesse reviver cada momento em que vibramos, crescemos e choramos juntos. Continuaremos a caminhar, sempre junto! Amo vocês.

*“A vocês que valorizaram meus sonhos, quando eu mesma não acreditava neles;
que me encorajaram a ir mais adiante, quando o medo me fazia hesitar;
que me aplaudiram e se emocionaram com cada batalha vencida, os meus mais profundos agradecimentos.
No mérito de minha conquista há muito de suas presenças.
Companhia, sorrisos, palavras e carinho foram expressões de amor profundo e armas desta vitória.
As alegrias de hoje também são suas. Meu carinho e minha gratidão.”*

A família Pilon em especial Antônia, Zé, Aline, Fernando e Daniela. Obrigada, vocês formam minha segunda família.

Aos meus amigos em especial Antônio Távora de A. Silva, Iara Helena Prieto, Beatriz Cury (Bea), Vanessa, Tatinha, Viviane, Meri, Bi, Ana, Aline (Zi), Marília, Dani, Érica, Karina, Bruna, e Ronaldo pelo companheirismo, amizade presente em todos esses anos.

“Depois de algum tempo a gente aprende que verdadeiras amizades continuam a crescer mesmo a longas distâncias. E o que importa não é o que você tem na vida, mas quem você tem na vida. E que bons amigos são a família que nos permitiram escolher.” (William Shakespeare)

A Fundação de Amparo a Pesquisa (FAPESP) pelo auxílio financeiro,
muito obrigado.

Ao amigo e exemplo de competência Prof. Dr. João Ernesto de Carvalho, os meus mais sinceros agradecimentos, por sua disponibilidade, competência, amizade e confiança, possibilitando a realização dos estudos de atividade antitumoral desse trabalho. Pelo carinho, paciência e dedicação em todos esses anos de convivência. Obrigada por tudo!!!

Agradecimentos

“Ser mestre não é apenas lecionar, ensinar não é só transmitir a matéria. Ser mestre é ser humano e amigo, guia e companheiro, é caminhar com o aluno e passo a passo transmitir-lhe o segredo da caminhada. Ser mestre é ser exemplo de dedicação, de doação, de dignidade pessoal e, sobretudo de amor.”

A *Gabriela de Menezes Marchetti* e *Sirlene Valério Tinti*, pela amizade presente em todos esses anos, além da colaboração indispensável na realização dos ensaios de atividade antitumoral.

A todos os amigos e colegas do CPQBA/UNICAMP pelo apoio e amizade sempre presente.

Ao Programa de Pós-graduação de Ciências Farmacêuticas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da UNESP-Araraquara, pela inserção neste programa.

À *Laura*, *Sônia* e *Claúdia*, secretárias do Programa de Pós-graduação de Ciências Farmacêuticas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da UNESP-Araraquara, pela disposição e atenção constantes em todos os momentos.

Aos técnicos e funcionários do Departamento de Fármacos e Medicamentos da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da UNESP-Araraquara, em particular as amigas e conselheiras *Margareth*, *Fátima* e *Queila S. Baraldo Leme*.

Aos técnicos e funcionários do Departamento de Princípios Ativos Naturais e Toxicologia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da UNESP-Araraquara, em particular a *Beth* e *Rosana* (*Farmacologia*) e a amiga e confidente *Sandrinha* (*Bioequivalência*).

“A todos vocês que estiveram comigo, nos dias mais anônimos, nas horas simples, a todos os pequenos gestos, as pequenas atenções; a todos que contribuíram para a construção desta vitória, o meu carinho, reconhecimento e gratidão.”

Todos somos ilhas, mas fazemos parte de um grande arquipélago, onde interagimos uns nos outros, indistintamente. Por isso agradeço aos colegas e amigos de Pós-graduação em especial *Arnóbio*, *Antonio Távora*, *Cris Franzini*, *Kelly*, *Cris Terruggi*, *Ketylin*, *Marlus*, *Nelsinho*, *Dani Michelin*, *Rubiana*, *Gustavo*, *Pri*, *Ana Luiza*, *Giseli*, *Andréia* e *Lucia* pela agradável convivência do dia a dia.

As estagiárias e amigas *Eliane Leão*, *Juliane Piovani* e *Claúdia Sato* pela amizade e auxílio no desenvolvimento desse trabalho.

Ao prof. *Dr. Celso Santilli* 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 de luz a baixo ângulo (SAXS) no Laboratório Nacional de Espalhamento de Luz Síncrotron - LNLS, da difratometria de raio-X (DRX) e de reologia.

A *Profa. Dra. Leila Aparecida Chiavacci* do Departamento de Fármacos e Medicamentos da Faculdade de Ciências Farmacêuticas, pela parceria, indispensável na

Agradecimentos

realização de toda parte de caracterização desse trabalho e pela crescente amizade cultivada de maneira tão singular. Obrigada por ajudar-me a soprar aos ventos os meus sonhos, fazendo com que eles se espalhassem pelos ares e voltassem para mim em forma de realidade.

Ao *Victor Hugo Vitorino Sarmiento* pela grande amizade presente em todos esses anos, além da colaboração indispensável na realização das análises de reologia.

A todos os professores do Departamento de Fármacos e Medicamentos e do Departamento de Princípios Ativos Naturais e Toxicologia, em especial *Profa. Dra. Maria Virgínia Scarpa, Profa. Dra. Maria Palmira Daflon Gremião, Prof. Dr. Raul César Evangelista, Profa. Dra. Ana Dóris de Castro, Profa. Dra. Hérida Regina Nunes Salgado, Prof. Dra. Chung Man Chin, Prof. Dr. Luis Vitor Silva do Sacramento, Profa. Dra. Leila Aparecida Chiavacci, Prof. Dr. Marcos Antonio Corrêa e Georgino Honorato de Oliveira* pelo apoio e auxílio.

Ao serviço técnico de Biblioteca e documentação e ao Serviço de apoio da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da UNESP-Araraquara pelo auxílio na atualização das referências e correção bibliográfica.

Você não é um acaso.... Você é uma realidade.

Nada nesta vida acontece por acaso. Ninguém chega até nós por um simples acaso. Um dito popular muito sábio diz: “As pessoas se encontram por acaso, mas não permanecem em nossa vida por causa desse simples acaso.” Agradeço a todos que, por acaso, compartilharam este trabalho comigo.

RESUMO

Dependendo da composição, uma mistura de tensoativos, óleo e água podem formar agregados supramoleculares com diferentes estruturas, que por sua vez podem influenciar significativamente na velocidade e no perfil de liberação de fármacos. Neste trabalho sistemas microemulsionados contendo 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, foram estudados. Microemulsões (ME) com e sem o fármaco antitumoral doxorubicina (DOX) foram preparadas e sua microestrutura foi caracterizada por reologia, microscopia de luz polarizada, espalhamento de luz a baixo ângulo (SAXS), difração de raio-X (DRX). Após a caracterização físico-química, avaliou-se a estabilidade física, a toxicidade aguda, os parâmetros bioquímicos com marcadores de cardiotoxicidade (CKMb) e hepatotoxicidade (AST, ALT) e atividade antitumoral “*in vivo*” da DOX veiculada nas ME. Os ensaios reológicos revelaram que o comportamento tixotrópico das amostras é dependente da sua composição. As medidas de microscopia de luz polarizada, SAXS e DRX indicam que o aumento da proporção de CHO/Sistema tensoativo permite à cristalização do colesterol em fases polimorfas as quais restringem a mobilidade das moléculas de DOX na fase interna da ME. Esses resultados também revelam que o aumento da concentração de colesterol na mistura fase oleosa/sistema tensoativo permite a formação de estruturas ordenadas com arranjos lamelares e cristais de CHO. Os estudos de estabilidade mostraram que a inclusão do OS a mistura tensoativa (EU/FS) favorece a estabilidade da ME. Os experimentos de toxicidade aguda (ratos *Wistar* e camundongos *Swiss*) mostraram que a DOX-ME apresentaram uma dose letal média (DL₅₀) maior do que a forma farmacêutica convencional. Os resultados dos parâmetros bioquímicos (CKMB, AST e ALT) mostraram que a DOX-ME apresentaram uma diminuição da cardiotoxicidade e da hepatotoxicidade quando comparado com a DOX convencional. Finalmente, os resultados e atividade antitumoral “*in vivo*” mostraram que as ME potencializaram a atividade citotóxica da DOX. Assim, a associação da DOX-ME pode ser uma alternativa na terapia do câncer.

ABSTRACT

Depending on the composition, the mixture of surfactant, oil and water, may form supramolecular aggregates with different structures which can significantly influence the drug release. In this work several microemulsion (ME) systems containing soya phosphatidylcholine (SPC) and polyoxyethylenglycerol trihydroxystearate 40 (ORPH) and Sodium Oleate (SO) as surfactant, cholesterol (CHO) as oil phase, and 0.01M Tris-HCl pH 7.2 as an aqueous phase were studied. MEs with and without the antitumoral drug doxorubicin (DOX) were prepared. The microstructures of the systems were characterized by rheological behavior, polarized light microscopy, small-angle X-ray scattering (SAXS) and X-ray diffraction (XRD). After the physicochemical characterization, the DOX was incorporated in the microemulsions, its physical stability, acute toxicity, biochemistry parameters with cardiotoxicity (CKMB) and hepatotoxicity (AST, ALT) and “*in vivo*” antitumoral activity from ME were also evaluated. The rheological behaviour reveals that depending on the composition ME system could exhibit a tixotropic behaviour. The measures of polarized light microscopy, SAXS and XRD showed that the high O/S ratio leads to the crystallization of cholesterol polymorphs phases which restricts the mobility of the DOX molecules into the ME structure. The increase of the cholesterol fraction in the oil phase/surfactant mixture leads to the formation of ordered structures with lamellar arrangements and CHO crystals. The stability studies showed that the OS incorporated in the surfactant mixtures (EU/FS) improves the stability of ME. The acute toxicity experiments (*Wistar* rats and *Swiss* mice) showed that the average lethal dose (DL₅₀) of DOX-ME was greater than the DOX free. The biochemistry parameters (CKMB, AST e ALT) results showed that the cardiotoxic and hepatotoxic effects were decreased in the DOX-ME compared to DOX free. Finally, the “*in vivo*” antitumoral activity showed that the cytotoxic activity was increased in the DOX- ME compared to DOX free. Thus, the association of the DOX-ME can be an alternative in cancer therapy.

ABREVIATURAS

Å	Angstrom
ALT	Alanina de aminotransferase
AST	Aspartato aminotransferase
A/O	Água em óleo
Apo A	Apolipoproteína A
Apo E	Apolipoproteína E
AUC	Área sob a curva
CHO	Colesterol
CK	Creatinina kinase
CKMB	Isoenzima MB da creatinina kinase
CL	Cristais líquidos
CMC	Carboximetilcelulose
CMC-DOX	Carboximetilcelulose associada a doxorrubicina
ConA-lipossoma- DOX	Lectina ConA lipossomas contendo doxorrubicina
DL50	Dose letal média
DLP	Doxorrubicina lipossomal peguilada
DOX	Doxorrubicina
DSC	Calorimetria exploratória diferencial
EHL	Equilíbrio hidrófilo-lipófilo
EM	Emulsão
EPP	Eritrodisestesia palmo-plantar
EU	Eumulgin® HRE 40
FA	Fosfatase alcalina
FCR	Taxa de remoção fracionária
FS	Fosfatidilcolina de soja
G*	Módulo de elasticidade complexo
G'	Módulo de estocagem
G''	Módulo de perda
G-6-PDH	Glicose 6-fosfato desidrogenase
GSH	Glutationa

GTO	Transaminase glutâmico oxalacética
HEC	Hidroxietilcelulose
Hep-2	Células Epiteliais Humanas
HK	Hexoquinase
ICC	Insuficiência cardíaca congestiva
i.p.	Intraperitoneal
LDE	Microemulsões lipídicas
LDH	Lactato desidrogenase
LDL	Lipoproteína de baixa densidade
LDL-r	Receptores de lipoproteína de baixa densidade
Lipo-DOX	Lipossomas furtivos contendo doxorubicina
LMA	Leucemia mielocítica aguda
LNLs	Laboratório Nacional de luz Sincotron (LNLs)
MDA	Malondialdeído
MDH	Maleato desidrogenase
ME	Microemulsões
ME-DOX	Microemulsões contendo doxorubicina
ME-OS	Microemulsão com oleato de sódio
ML-Magh	Nanopartículas de maghemita recobertas com citrato encapsulado em lipossomas
NCI-H292	Carcinoma de pulmão
NPM	Nanopartículas magnéticas
O/A	Óleo em água
ORPH	Óleo de rícino polioxil-40-hidrogenado
OS	Oleato de Sódio
PCS	Espectroscopia de fotocorrelação
PEG	Polietilenoglicóis
6 PG	6-Fosfogluconato
PLGA	Poli(ácido láctico co-glicólico)
PP	Fator de empacotamento
Q	Vetor de espalhamento
RMN	Ressonância magnética nuclear
SANS	Espalhamento de nêutrons a baixo ângulo

SAXS	Espalhamento de raio-X a baixo ângulo
SFM	Sistema fagocítico mononuclear
TAE	Tumor ascítico de Erlich
TCL	Triglicerídio de cadeia longa
TCM	Triglicerídio de cadeia média
TMB	Taxa metabólica basal

LISTA DE TABELAS

TABELA 1. Principais diferenças entre as emulsões e microemulsões.	7
TABELA 2. ME contendo Eumulgin® HRE40, FS e OS como mistura de tensoativos, Colesterol como fase oleosa e tampão Tris-HCl 0.01M pH 7,2 como fase aquosa e DOX.	40
TABELA 3. ME contendo Eumulgin® HRE40 e FS como mistura de tensoativos, Colesterol como fase oleosa e tampão Tris-HCl 0.01M pH 7,2 como fase aquosa e DOX.	40
TABELA 4. Comportamento de fluxo (n) e índice de consistência (K) para as formulações preparadas com concentração fixa de fase aquosa e aumento da concentração de CHO, como fase oleosa contendo 2mg/mL de DOX.	61
TABELA 5. Valores dos parâmetros estruturais obtidos a partir das curvas de SAXS para as formulações preparadas com concentração fixa de fase aquosa e aumento da concentração de CHO, como fase oleosa.	85
TABELA 6. Valores dos parâmetros estruturais obtidos a partir das curvas de SAXS para as formulações preparadas com concentração fixa de fase aquosa e aumento da concentração de CHO, como fase oleosa contendo 2mg/mL de Doxorubicina.	85
TABELA 7. Valores dos parâmetros estruturais obtidos a partir das curvas de SAXS para as formulações preparadas com concentração fixa de fase aquosa e aumento da concentração CHO como fase oleosa.	90
TABELA 8. Valores dos parâmetros estruturais obtidos a partir das curvas de SAXS para as formulações preparadas com concentração fixa de fase aquosa e aumento da concentração CHO como fase oleosa contendo 2mg/mL de Doxorubicina.	91
TABELA 9. Mortalidade de ratos <i>Wistar</i> que receberam o cloridrato de doxorubicina.	109
TABELA 10. Mortalidade de camundongos <i>Swiss</i> que receberam o cloridrato de doxorubicina.	109
TABELA 11. Mortalidade dos ratos <i>Wistar</i> que receberam as microemulsões sem oleato de sódio contendo doxorubicina.	110
TABELA 12. Mortalidade dos camundongos <i>Swiss</i> que receberam as microemulsões sem oleato de sódio contendo doxorubicina.	111
TABELA 13. Mortalidade dos ratos <i>Wistar</i> que receberam as microemulsões com oleato de sódio contendo doxorubicina.	111

TABELA 14. Mortalidade dos camundongos *Swiss* que receberam as microemulsões 112 com oleato de sódio contendo doxorubicina.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1. Fotografia mostrando o aspecto de uma microemulsão em comparação com uma emulsão simples.	6
FIGURA 2. Seqüência idealizada de estruturas líquido-cristalinas, micelares e microemulsionadas formadas dependendo do parâmetro de empacotamento (ditado pela geometria da molécula), teor de água e temperatura, em que v/al é o fator de empacotamento.	9
FIGURA 3. Representação esquemática da organização das microemulsões.	10
FIGURA 4. Estrutura química da fosfatidilcolina.	12
FIGURA 5. Estrutura química do oleato de sódio.	12
FIGURA 6. Estrutura química do colesterol.	14
FIGURA 7. Método da titulação com co-tensioativo utilizado para o preparo das microemulsões.	16
FIGURA 8. Representação da classificação de Winsor. A) Winsor I. B) Winsor III. C) Winsor II. D) Emulsão homogênea. E) Winsor IV.	17
FIGURA 9. Mecanismo de ação das microemulsões denominadas de LDE nas células tumorais e normais.	18
FIGURA 10. Estrutura química da doxorubicina.	22
FIGURA 11. Representação esquemática de alguns sistemas transportadores de fármacos. A) Nanopartícula magnética encapsulada em lipossomas; B) Micelas; C) Microcápsulas; D) Micropartículas.	25
FIGURA 12. Diagrama esquemático das principais regiões das curvas de SAXS.	45
FIGURA 13. Esquema do aparelho utilizado para determinação do diâmetro das gotículas por espalhamento de luz.	50
FIGURA 14. Tensão de cisalhamento x velocidade de cisalhamento das ME estabilizada com 18,5; 17, 15; 14 e 12,5% de EU/FS/OS (35:35:30 p/p), contendo 1,5; 3; 5; 6 e 7,5% de CHO, como fase oleosa e 80% de fase aquosa (A); viscosidade aparente x velocidade de cisalhamento (B).	58
FIGURA 15. Tensão de cisalhamento x velocidade de cisalhamento das ME estabilizada com 18,5; 17, 15; 14 e 12,5% de EU/FS/OS (35:35:30 p/p), contendo 1,5; 3; 5; 6 e 7,5% de CHO, como fase oleosa e 80% de fase aquosa com 2mg/mL de DOX (A); viscosidade aparente x velocidade de cisalhamento (B).	59
FIGURA 16. Evolução dos módulos de armazenagem G' e de perda G'' da ME	63

estabilizada com 18,5; 17; 15; 14 e 12,5% de EU/FS/OS (35:35:30 p/p), contendo 1,5; 3; 5; 6 e 7,5% de CHO, como fase oleosa e 80% de fase aquosa, respectivamente.

FIGURA 17. Evolução dos módulos de estocagem G' e de perda G'' da ME 64 estabilizada com 18,5; 17; 15; 14 e 12,5% de EU/FS/OS (35:35:30 p/p), contendo 1,5; 3; 5; 6 e 7,5% de CHO, como fase oleosa e 80% de fase aquosa e 2mg/mL de DOX, respectivamente.

FIGURA 18. Evolução temporal da compliância das ME sem (A) e com DOX (B) 65 estabilizada com 18,5; 17; 15; 14 e 12,5% de EU/FS/OS (35:35:30 p/p), contendo 1,5; 3; 5; 6 e 7,5% de CHO, como fase oleosa e 80% de fase aquosa, respectivamente..

FIGURA 19. Valores de compliância a 119s (etapa de fluência) das ME em função da 66 quantidade de colesterol.

FIGURA 20. Tensão de cisalhamento x velocidade de cisalhamento das ME 67 estabilizada com 17, 14, 10, 8 e 5% de EU/FS (1:1) contendo 3, 6, 10, 12 e 15% de CHO, como fase oleosa e 80% de fase aquosa (A) e 2mg/mL de DOX (B), respectivamente.

FIGURA 21. Curva log-log de viscosidade versus velocidade de cisalhamento para 69 diversas ME preparadas com diferentes quantidades de CHO sem (A) e com (B) 2mg/mL de DOX.

FIGURA 22. Variação da tensão limite de escoamento (τ_y), do índice de consistência 71 (K) e do comportamento de fluxo (n) em função da % de CHO utilizado na preparação das ME sem e com incorporação do fármaco, respectivamente.

FIGURA 23. . Evolução dos módulos de estocagem G' e de perda G'' da ME, em 72 função das quantidades de 3, 6, 10, 12 e 15% de CHO.

FIGURA 24. Evolução dos módulos de estocagem G' e de perda G'' da ME, em 73 função das quantidades de 3, 6, 10, 12 e 15% de CHO para ME preparadas com DOX.

FIGURA 25. Variação da $\tan \delta$ em função da frequência para ME com DOX com várias 74 proporções de CHO.

FIGURA 26. Evolução temporal dos diagramas de fluência-relaxação da ME 75 estabilizada com 17, 14, 10, 8 e 5% de EU/FS (1:1), contendo 3, 6, 10, 12 e 15% de CHO, como fase oleosa e 80% de fase aquosa, respectivamente.

FIGURA 27. Evolução temporal dos diagramas de fluência-relaxação da ME 76 estabilizada com 17, 14, 10, 8 e 5% de EU/FS (1:1), contendo 3, 6, 10, 12 e 15% de CHO, como fase oleosa, 80% de fase aquosa e 2mg/mL de DOX, respectivamente.

- FIGURA 28.** Fotomicrografia representativa da ME estabilizada com 18,5 e 17% de EU/FS/OS (35:35:30 p/p), contendo 1,5 e 3% de CHO, como fase oleosa e 80% de fase aquosa. *Formulações: A₁, A₂, respectivamente.* Aumento 20x. 77
- FIGURA 29.** Fotomicrografia representativa da ME estabilizada com 18,5 e 17% de EU/FS/OS (35:35:30 p/p), contendo 1,5 e 3% de CHO, como fase oleosa, 80% de fase aquosa e 2mg/mL de Dox. *Formulações: A₁, A₂, respectivamente.* Aumento 20x. 77
- FIGURA 30.** Fotomicrografia representativa da ME estabilizada com 15, 14 e 12,5% de EU/FS/OS (35:35:30 p/p), contendo 5, 6 e 7,5 % de CHO, como fase oleosa e 80% de fase aquosa. *Formulações: A₃, A₄ e A₅, respectivamente.* Aumento 20x 78
- FIGURA 31.** Fotomicrografia representativa da ME estabilizada com 15, 14 e 12, 5% de EU/FS/OS (35:35:30 p/p), contendo 5 6 e 7,5% CHO, como fase oleosa, 80% de fase aquosa e 2mg/mL de Dox. *Formulações: A₃, A₄ e A₅, respectivamente.* Aumento 20x. 78
- FIGURA 32.** Fotomicrografia da ME estabilizada com 17% de EU/FS (1:1), contendo 3 % de CHO, como fase oleosa e 80% de fase aquosa. *Formulação: B₁.* Aumento 20x. 79
- FIGURA 33.** Fotomicrografia da ME estabilizada com 17% de EU/FS (1:1), contendo 3 % de CHO como fase oleosa, 80% de fase aquosa e 2mg/mL de Dox. *Formulação: B₁.* Aumento 20x. 79
- FIGURA 34.** Fotomicrografia da ME estabilizada com 14% de EU/FS (1:1), contendo 6 % de CHO, como fase oleosa e 80% de fase aquosa. *Formulação: B₂.* Aumento 20x. 80
- FIGURA 35.** Fotomicrografia da ME estabilizada com 14% de EU/FS (1:1), contendo 6 % de CHO como fase oleosa, 80% de fase aquosa e 2mg/mL de Dox. *Formulação: B₂.* Aumento de 20x. 80
- FIGURA 36.** Fotomicrografia representativa da ME estabilizada com 10, 8 e 5% de EU/FS (1:1), contendo 10, 12 e 15 % de CHO, como fase oleosa e 80% de fase aquosa. *Formulações: B₃, B₄ e B₅, respectivamente.* Aumento 20x. 80
- FIGURA 37.** Fotomicrografia representativa da ME estabilizada com 10, 8 e 5% de EU/FS (1:1), contendo 10, 12 e 15 % de CHO como fase oleosa, 80% de fase aquosa e 2mg/mL de Dox. *Formulações: B₃, B₄ e B₅, respectivamente.* Aumento de 20x. 80
- FIGURA 38.** Fotomicrografia da solução aquosa de colesterol ([CHO]= 0,2 mg/mL). Controle positivo. Aumento 20x. 81
- FIGURA 39.** Evolução estrutural das ME estabilizada com 18,5; 17; 15; 14 e 12,5% de EU/FS/OS (35:35:30 p/p), contendo 1,5; 3; 5; 6 e 7,5% de CHO, como fase oleosa 82

e 80% de fase aquosa, respectivamente.

FIGURA 40. Evolução estrutural das ME estabilizada com 18,5; 17; 15; 14 e 12,5% de EU/FS/OS (35:35:30 p/p), contendo 1,5; 3; 5; 6 e 7,5% de CHO, como fase oleosa e 80% de fase aquosa e 2mg/mL de Dox, respectivamente. 82

FIGURA 41. Curva da intensidade de espalhamento $I(q)$ em função do vetor de espalhamento (q) para uma amostra representativa da região de microemulsão contendo oleato de sódio. A linha contínua representa o ajuste do modelo de Beaucage, o qual prevê a correlação entre as gotículas. 84

FIGURA 42. Evolução estrutural das ME estabilizada com 17, 14, 10, 8 e 5% de EU/FS (1:1), contendo 3, 6, 10, 12 e 15% de CHO, como fase oleosa e 80% de fase aquosa, respectivamente. 87

FIGURA 43. Evolução estrutural das ME estabilizada com 17, 14, 10, 8 e 5% de EU/FS (1:1), contendo 3, 6, 10, 12 e 15% de CHO, como fase oleosa e 80% de fase aquosa e 2mg/mL de Dox, respectivamente. 87

FIGURA 44. Curva da intensidade de espalhamento $I(q)$ em função do vetor de espalhamento (q) para uma amostra representativa da região de microemulsão sem oleato de sódio. A linha contínua representa o ajuste do modelo de Beaucage, o qual prevê a correlação entre as gotículas. 89

FIGURA 45. Evolução dos difratogramas das ME estabilizada com 14, 10, 8 e 5% de EU/FS (1:1), contendo 6, 10, 12 e 15% de CHO, como fase oleosa e 80% de fase aquosa, respectivamente. 93

FIGURA 46. Evolução dos difratogramas das ME estabilizada com 14, 10, 8 e 5% de EU/FS (1:1), contendo 6, 10, 12 e 15% de CHO, como fase oleosa e 80% de fase aquosa e 2mg/mL de Dox, respectivamente. 93

FIGURA 47. Evolução dos difratogramas das ME estabilizada com 15, 14 e 12,5% de EU/FS/OS (35:35:30 p/p), contendo 5, 6 e 7,5% de CHO, como fase oleosa e 80% de fase aquosa e 2mg/ML de Dox, respectivamente. 94

FIGURA 48. Perfil de liberação “*in vitro*” da doxorrubicina em microemulsões estabilizadas com EU/FS. 95

FIGURA 49. Microemulsões estabilizada com 18,5; 17; 15; 14 e 12,5% de EU/FS/OS (35:35:30 p/p), contendo 1,5; 3; 5; 6 e 7,5% de CHO, como fase oleosa e 80% de fase aquosa, respectivamente. Sistemas fotografados após a preparação das ME. 98

FIGURA 50. Microemulsões estabilizada com 18,5; 17; 15; 14 e 12,5% de EU/FS/OS 98

(35:35:30 p/p), contendo 1,5; 3; 5; 6 e 7,5% de CHO, como fase oleosa e 80% de fase aquosa, respectivamente. Sistemas fotografados seis meses após a preparação das ME.

FIGURA 51. Microemulsões estabilizada com 18,5; 17; 15; 14 e 12,5% de EU/FS/OS 98

(35:35:30 p/p), contendo 1,5; 3; 5; 6 e 7,5% de CHO, como fase oleosa e 80% de fase aquosa e 2mg/mL de Dox, respectivamente. Sistemas fotografados após a preparação das ME.

FIGURA 52. Microemulsões estabilizada com 18,5; 17; 15; 14 e 12,5% de EU/FS/OS 98

(35:35:30 p/p), contendo 1,5; 3; 5; 6 e 7,5% de CHO, como fase oleosa e 80% de fase aquosa e 2mg/mL de Dox, respectivamente. Sistemas fotografados seis meses após a preparação das ME, respectivamente.

FIGURA 53. Microemulsões estabilizada com 17, 14, 10, 8 e 5% de EU/FS (1:1), 99

contendo 3, 6, 10, 12 e 15% de CHO, como fase oleosa e 80% de fase aquosa, respectivamente. Sistemas fotografados após a preparação das ME.

FIGURA 54. Microemulsões estabilizada com 17, 14, 10, 8 e 5% de EU/FS (1:1), 99

contendo 3, 6, 10, 12 e 15% de CHO, como fase oleosa e 80% de fase aquosa, respectivamente. Sistemas fotografados seis meses após a preparação das ME.

FIGURA 55. Microemulsões estabilizada com 17, 14, 10, 8 e 5% de EU/FS (1:1), 100

contendo 3, 6, 10, 12 e 15% de CHO, como fase oleosa e 80% de fase aquosa e 2mg/ml de Dox, respectivamente. Sistemas fotografados após a preparação das ME.

FIGURA 56. Microemulsões estabilizada com 17, 14, 10, 8 e 5% de EU/FS (1:1), 100

contendo 3, 6, 10, 12 e 15% de CHO, como fase oleosa e 80% de fase aquosa e 2mg/ml de Dox, respectivamente. Sistemas fotografados seis meses após a preparação das ME.

FIGURA 57. Turbidez das ME estabilizada com 18,5; 17; 15; 14 e 12,5% de 101

EU/FS/OS (35:35:30 p/p), contendo 1,5; 3; 5; 6 e 7,5% de CHO, como fase oleosa e 80% de fase aquosa, respectivamente. A_1 ($v= 3,21.10^{-3} Abs/h$), A_2 ($2,90.10^{-3} Abs /h$), A_3 ($v= 3,71.10^{-3} Abs /h$), A_4 ($5,46.10^{-3} Abs /h$), A_5 ($v= 2,53.10^{-3} Abs /h$).

FIGURA 58. Turbidez das ME estabilizada com 18,5; 17; 15; 14 e 12,5% de 101

EU/FS/OS (35:35:30 p/p), contendo 1,5; 3; 5; 6 e 7,5% de CHO, como fase oleosa e 80% de fase aquosa e 2mg/mL de DOX, respectivamente. A_1 ($v= 2,71.10^{-3} Abs/h$), A_2 ($3,54.10^{-3} Abs /h$), A_3 ($v= 3,69.10^{-3} Abs /h$), A_4 ($4,24.10^{-3} Abs /h$), A_5 ($v= 3,98.10^{-3} Abs /h$).

FIGURA 59. Turbidez das ME estabilizada com 17, 14, 10, 8 e 5% de EU/FS (1:1), 102

contendo 3, 6, 10, 12 e 15% de CHO, como fase oleosa e 80% de fase aquosa, respectivamente. B₁ ($v= 3,11.10^{-3} Abs/h$), B₂ ($3,47.10^{-3} Abs /h$), B₃ ($v= 3,90.10^{-3} Abs /h$), B₄ ($2,05.10^{-3} Abs /h$), B₅ ($v= 1,82.10^{-3} Abs /h$).

FIGURA 60. Turbidez das ME estabilizada com 17, 14, 10, 8 e 5% de EU/FS (1:1), 102 contendo 3, 6, 10, 12 e 15% de CHO, como fase oleosa e 80% de fase aquosa e 2mg/mL de DOX, respectivamente. B₁ ($v= 4,92.10^{-3} Abs/h$), B₂ ($5,39.10^{-3} Abs /h$), B₃ ($v= 4,72.10^{-3} Abs /h$), B₄ ($4,70.10^{-3} Abs /h$), B₅ ($v= 4,72.10^{-3} Abs /h$).

FIGURA 61. Velocidade de crescimento das gotículas das ME estabilizada com 103 EU/FS (1:1) contendo OS/CHO 1:1 molar (n=3).

FIGURA 62. Velocidade de crescimento das gotículas das ME estabilizadas por 103 EU/FS (1:1) contendo somente colesterol (n=3).

FIGURA 63. Diâmetro da gotícula das ME estabilizada com 18,5; 17; 15; 14 e 12,5% 105 de EU/FS/OS (35:35:30 p/p), contendo 1,5; 3; 5; 6 e 7,5% de CHO, como fase oleosa e 80% de fase aquosa, respectivamente.

FIGURA 64. Diâmetro das gotículas das ME estabilizada com 18,5; 17; 15; 14 e 105 12,5% de EU/FS/OS (35:35:30 p/p), contendo 1,5; 3; 5; 6 e 7,5% de CHO, como fase oleosa e 80% de fase aquosa e 2mg/mL de Dox, respectivamente.

FIGURA 65. Diâmetro da gotícula das ME estabilizada com 17, 14, 10, 8 e 5% de 106 EU/FS (1:1), contendo 3, 6, 10, 12 e 15% de CHO, como fase oleosa e 80% de fase aquosa, respectivamente.

FIGURA 66. Diâmetro das gotículas das ME estabilizada com 17, 14, 10, 8 e 5% de 106 EU/FS (1:1), contendo 3, 6, 10, 12 e 15% de CHO, como fase oleosa e 80% de fase aquosa e 2mg/mL de Dox, respectivamente.

FIGURA 67. Perfil de liberação “*in vitro*” da doxorubicina em microemulsões 107 estabilizadas com EU/FS/OS.

FIGURA 68. Relação log da dose-resposta no teste de toxicidade aguda com o 114 cloridrato de doxorubicina, microemulsões sem oleato de sódio contendo doxorubicina e microemulsões com oleato de sódio contendo doxorubicina, em ratos, via intraperitoneal.

FIGURA 69. Relação log da dose-resposta no teste de toxicidade aguda com o 115 cloridrato de doxorubicina, microemulsões sem oleato de sódio contendo doxorubicina e microemulsões com oleato de sódio contendo doxorubicina, em camundongos, via intraperitoneal.

- FIGURA 70.** Razão pós-tratamento / pré-tratamento da CKMB em função da dose 118
administrada.
- FIGURA 71** Razão pós-tratamento / pré-tratamento da transaminase AST em função 121
da dose administrada.
- FIGURA 72.** Razão pós-tratamento / pré-tratamento da transaminase ALT em função 122
da dose administrada.
- FIGURA 73.** Efeito antitumoral “*in vivo*” da microemulsão com oleato de sódio 124
contendo doxorubicina.
- FIGURA 74.** Efeito antitumoral “*in vivo*” da microemulsão sem oleato de sódio 126
contendo doxorubicina.

SUMÁRIO

I. INTRODUÇÃO	1
II. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	5
2.1 <i>MICROEMULSÕES.</i>	5
2.1.1 Principais componentes utilizados no preparo de microemulsões destinadas à aplicação parenteral em oncologia.	8
2.1.2 Preparo e caracterização das microemulsões destinadas à aplicação parenteral em oncologia.	15
2.1.3 Microemulsões lipídicas como nova perspectiva de tratamento do câncer.	17
2.1.4 Doxorrubicina como modelo de fármaco antitumoral utilizado na terapia do câncer.	21
2.1.4.1 Sistemas transportadores contendo doxorrubicina	24
III. OBJETIVO	36
IV. MATERIAL E MÉTODOS	37
4.1 Material	37
4.2 Métodos	39
V. RESULTADOS E DISCUSSÃO	57
VI. CONCLUSÃO	127
VII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	130
VIII. ANEXO	156

I. INTRODUÇÃO

A nanotecnologia de sistemas de liberação prolongada de fármacos surgiu no início da década de 80, como um método comercialmente atrativo para administração de fármacos e obtenção de sua ação prolongada. Sistemas nanoestruturados são aplicáveis no controle da liberação de fármacos, modulando a velocidade com que estes atravessam as barreiras biológicas, penetram à circulação e atingem o alvo farmacológico. Além disso, podem atuar como sistemas de vetorização de fármacos, permitindo direcionar o fármaco no organismo evitando seu acúmulo em tecidos não específicos, tornando-o menos tóxico e elevando sua concentração no local em que deve exercer seu efeito farmacológico (OLIVEIRA e SCARPA, 2001; OLIVEIRA *et al.*, 2004).

A literatura mostra que a biodisponibilidade de um fármaco pode ser modificada pelo uso de vetores medicamentosos e partículas poliméricas. 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 principalmente obtidos através do uso desses vetores nanoestruturados nos tratamentos com antineoplásicos (GIBAUD *et al.*, 1996; RODRIGUES *et al.*, 2002).

Dentre os vários sistemas nanoestruturados atualmente conhecido, as microemulsões (ME) têm sido utilizadas com sucesso como veículos para uma grande variedade de fármacos e substâncias biologicamente ativas como, por exemplo, anti-inflamatórios não esteroidais, vacinas a base de DNA, antineoplásicos e analgésicos (CORREA, 1996; DALMORA *et al.*, 2001; WARGAFTIGI, 2000; MARANHÃO *et al.*, 2002).

Os sistemas micro e nanoemulsionados são capazes de compartimentalizar fármacos nas gotículas da fase interna, as quais possuem propriedades físico-químicas bastante diferentes das do meio dispersante, induzindo modificações nas propriedades biológicas dos fármacos incorporados (BHARGAVA *et al.*, 1987). Além disso, esses sistemas melhoram a solubilização de fármacos lipofílicos em água e os protegem contra hidrólise enzimática, além de aumentar o potencial de absorção devido à presença de tensoativo (FORMARIZ *et al.*, 2005).

Uma das vantagens das ME frente a outros sistemas dispersos, tais como as suspensões, emulsões e lipossomas é sua estabilidade termodinâmica e conseqüentemente seu tempo de vida útil muito mais amplo (CRUZ e UCKUN, 2001). Esses sistemas representam

um eficiente veículo para administração de fármacos, permitindo adequada solubilização na fase interna, oleosa ou aquosa, ou na mistura fase interna/tensoativos (ACTIS *et al.*, 1999). As ME O/A são eficientes veículos de administração “*in vivo*” e podem ser empregados para fármacos lipofílicos em especial aqueles que se solubilizam adequadamente na fase oleosa ou na mistura óleo/tensoativo (CONSTANTINIDES, 1995), enquanto que as ME A/O podem ser utilizadas para fármacos hidrofílicos. Esse sistema apresenta algumas vantagens tais como transparência, alta estabilidade, fácil preparação e capacidade de incorporar fármacos com diferentes propriedades físico-químicas (ABOOFAZELI *et al.*, 2000).

Entre as patologias atuais, as neoplasias constituem 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). No Brasil é a terceira causa de morte e vêm sendo indicadas nos inquéritos epidemiológicos como causa *mortis* muito freqüente em nosso país (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 adversos severos. 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 mostram 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 à 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, sobretudo 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 ratos, camundongos, cuja morfologia, considerando os diferentes tipos histológicos como tumores de pele e estruturas associadas também são conhecidas (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 HALLOWES, 1973).

A doxorubicina (DOX) é um antineoplásico derivado das antraciclinas, com amplo espectro de ação, sendo um dos mais utilizados na terapêutica (MITRA *et al.*, 2001) no tratamento de tumores sólidos e leucemias. Atua bloqueando a síntese de RNA, inibindo tanto a DNA como a RNA nucleotidiltransferases, através da intercalação entre os pares de bases dos ácidos nucléicos (MIGLIETTA *et al.*, 2000; MITRA *et al.*, 2001). Porém, em razão de sua ação inespecífica o fármaco também provoca efeitos colaterais, tais como cardiotoxicidade e mielossupressão, relacionados com a dose administrada que limitam a dose cumulativa máxima (SACCO *et al.*, 2001). A dose administrada é de 1,2 a 2,4mg/Kg, intravenosamente a cada três semanas. Para contornar esses problemas, foi desenvolvido um sistema de lipossomas contendo DOX chamado CaelyxTM/Doxil[®], o qual encontra-se disponível no mercado farmacêutico (SCHERING-SCHERING-PLOUCH, 2004). Esse sistema veicula doses terapêuticas da DOX, diretamente para as células tumorais, apresentando toxicidade bastante reduzida (CALTEL *et al.*, 2003). Porém, o Doxil[®] apresenta algumas desvantagens na administração, pois deve ser reconstituído no momento do uso, sendo estável por apenas 24 horas depois de reconstituição, e seu custo é bastante elevado.

O desenvolvimento de ME contendo DOX podem diminuir sua toxicidade, mas testes toxicológicos devem ser realizados para garantir a segurança no uso da DOX quando incorporada neste sistema.

A avaliação toxicológica consiste na análise de dados toxicológicos de um composto químico ou de uma substância, tendo como finalidade classificá-la toxicologicamente, fornecendo informações sobre a forma correta de seu emprego (LARINI, 1997).

A toxicidade aguda é um dos testes utilizados na avaliação toxicológica e consiste em avaliar os efeitos adversos que ocorrem em um curto período de tempo após a administração de uma única dose ou múltiplas doses de determinada substância dentro de um período de 24 horas (BARROS e DAVINO, 2003).

A dose letal média (DL_{50}) é utilizada para identificar a toxicidade relativa da substância em questão (DOX), representando a probabilidade de uma dose causar efeito letal em 50% dos animais de uma população. Estudos de toxicidade também podem indicar a dose mínima necessária para produzir uma resposta detectável em uma população em teste (BARROS e DAVINO, 2003).

Dessa maneira é relevante o estudo de sistemas carreadores para DOX, na tentativa de melhorar a relação risco / efeito terapêutico através do aumento da eficácia terapêutica e diminuição dos efeitos colaterais.

II. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 MICROEMULSÕES

A formação de microestruturas em soluções aquosas de tensoativos é um fenômeno comum de auto-organização molecular como forma de atingir a estabilidade termodinâmica. Esse fenômeno torna-se a base para a aplicação tecnológica dos tensoativos como sistemas organizados nas ciências biológicas. Moléculas de tensoativos comumente se auto-agregam na presença de água formando uma rica variedade de estruturas, quando são variados os parâmetros de concentração de tensoativos, presença de sal ou a temperatura. Em soluções diluídas, soluções isotrópicas de agregados micelares podem ser formadas, enquanto que em sistemas tensoativo-solvente em concentrações mais elevadas, fases líquido-cristalinas isotrópicas e anisotrópicas podem existir. Esses agregados tornam-se mais estruturados quando um óleo ou mesmo outros componentes, como outro tensoativo ou um álcool de cadeia média, é adicionado ao sistema tensoativo-água (EZRAHI *et al.*, 1999).

Dessa forma, a mistura de tensoativos com água, em determinadas proporções, na ausência ou na presença de substâncias lipofílicas pode formar diferentes tipos de agregados, entre os quais agregados polimorfos representados pelas emulsões (EM), microemulsões (ME) e mesofases liotrópicas - os cristais líquidos (CL), que estão intimamente ligados com a proporção e a natureza dos componentes da mistura (FORMARIZ *et al.*, 2005).

Uma parte desses trabalhos tem sido dirigida para o estudo de ME, CL e estruturas cristalinas de cristais de colesterol, visando ao aumento da solubilidade e da estabilidade de fármacos, a possibilidade de incorporação de fármacos hidrofílicos ou lipofílicos, a capacidade de agir como sistemas reservatórios, a diminuição da toxicidade, assim como a alteração da biodisponibilidade, dependendo do tipo de interação entre fármaco e o sistema de administração (CONSTANTINIDES *et al.*, 1995; CONSTANTINIDES, 1995; BRINON *et al.*, 1999; GABBOUN *et al.*, 2001); pois as formas farmacêuticas antitumorais convencionais são relativamente simples: os fármacos solúveis e pouco solúveis em água são formulados na forma de pó liofilizado. Entretanto, essa formulação apresenta como inconveniente 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 (PRETE *et al.*, 2006; FORMARIZ *et al.*, 2006; DIAS *et al.*, 2007).

O termo microemulsão foi introduzido na década de 40 por Hoar e Schulman para definir um sistema fluido e semi-transparente obtido pela titulação até o ponto de clarificação de uma emulsão simples com um álcool de cadeia média como o hexanol ou o pentanol. No ponto de clarificação não foi necessária agitação e uma dispersão transparente foi formada espontaneamente. Estes pesquisadores observaram, através de microscopia eletrônica, que as dispersões transparentes formadas eram constituídas de microgotículas de óleo em água (O/A) ou água em óleo (A/O), cercadas por um filme interfacial misto de tensoativo e co-tensoativo (álcool). O tamanho das gotículas variava de 100 a 600 nm, significativamente menores que os da emulsão simples inicial, justificando seu aspecto transparente e o termo microemulsão (Figura 1) (HOAR e SCHULMAN, 1943).

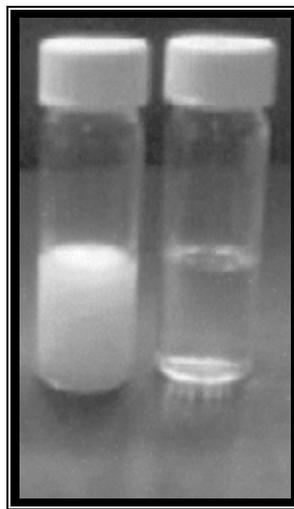


FIGURA 1: Fotografia mostrando o aspecto de uma microemulsão em comparação com uma emulsão simples.

(FORMARIZ *et al.*, 2005)

Este termo foi revisado muitas vezes e a definição atualmente mais aceita descreve as microemulsões como dispersões coloidais de água e óleo, estabilizadas por um tensoativo e por um co-tensoativo quando necessário, opticamente transparentes ou semi-transparentes, termodinamicamente estáveis, apresentam partículas de tamanho menor que 1,0 μ m e, portanto, passíveis de serem esterilizadas por filtração. Além disso, as microemulsões apresentam baixa viscosidade, possuem grande capacidade para o transporte de fármacos, demonstram comprovada propriedade promotora de absorção para os fármacos veiculados e são facilmente obtidas, sem a necessidade de utilização de equipamentos sofisticados e de componentes de custo proibitivo (CUNHA-JÚNIOR *et al.*, 2003).

Entretanto, o termo microemulsão lipídica também chamada de LDE, foi introduzido somente na década de 80, por Maranhão e colaboradores para definir um sistema microemulsionado rico em colesterol obtido pela técnica de sonicação até o ponto de clarificação de uma ME comum (MARANHÃO *et al.*, 1986). Esses sistemas diferem das ME comuns por apresentarem colesterol na sua formulação e capacidade de direcionamento para o interior das células tumorais, minimizando os efeitos tóxicos dessa classe de fármacos (MARANHÃO *et al.*, 1992).

Ambos os sistemas, microemulsionados comuns e microemulsionados lipídicos diferem das emulsões simples por apresentarem tensão interfacial bem menor (FLORENCE e ATTWOOD, 1998), já que as moléculas do co-tensoativo se intercalam entre as moléculas do tensoativo na interface óleo-água afetando a curvatura da gotícula. Esta baixa tensão interfacial promove a formação espontânea desses sistemas pseudomonofásicos, não havendo necessidade de imposição de uma força externa, além da formação de gotículas de tamanho reduzido e a estabilidade termodinâmica do sistema. Já as emulsões simples são dispersões grosseiras bifásicas, turvas ou leitosas, termodinamicamente instáveis e requerem energia externa para sua formação (TENJARLA, 1999). A Tabela a seguir mostra as principais diferenças entre as EM e ME.

TABELA 1: Principais diferenças entre as emulsões e microemulsões (TENJARLA, 1999).

<i>EMULSÕES</i>	<i>MICROEMULSÕES</i>
Termodinamicamente instáveis tendendo a separação de fases	Termodinamicamente estáveis
Diâmetro das gotículas da ordem de 2000-100000Å	Diâmetro das gotículas da ordem de 1000-20000nm
Sistemas relativamente estáticos	Sistemas altamente dinâmicos
Área interfacial moderadamente grande	Área interfacial bastante grande
Pouco tensoativo é requerido para estabilização	Grande quantidade de tensoativo é necessária para estabilização
Pequena curvatura da interface O/A	O filme interfacial pode estar altamente curvado

A principal desvantagem desses sistemas microemulsionados relaciona-se à utilização de elevadas concentrações de tensoativos e co-tensoativos em relação às emulsões, possibilitando a ocorrência de irritação no local de aplicação. Assim, esses adjuvantes, além

de apresentarem como objetivo principal permitir a formação dos sistemas devem, também, ser atóxicos e apresentar registro para emprego em produtos farmacêuticos. Entretanto, esta limitação varia dependendo do uso pretendido para a preparação em questão, havendo maior disponibilidade de substâncias para produtos que visam à administração cutânea, maiores restrições aos que se destinam à via oral e, principalmente, aos que devem ser preparados de forma estéril (parenterais e oftálmicos) (CUNHA-JÚNIOR *et al.*, 2003).

2.1.1 Principais componentes utilizados no preparo de microemulsões destinadas à aplicação parenteral em oncologia

Um dos maiores problemas associados ao desenvolvimento de sistemas de liberação de fármacos é a escolha dos constituintes. Essa escolha deve ser bastante criteriosa, e deve atender alguns requisitos, tais como, não irritabilidade, atoxicidade, capacidade de formar o sistema desejado (LAWRENCE e REES, 2000).

A) Agentes tensoativos

A molécula de um tensoativo pode ser encontrada como um monômero em solventes hidrofílicos apenas quando sua concentração é baixa, uma vez que a interação entre a cauda apolar e o meio aquoso é altamente desfavorável. O aumento da concentração do tensoativo requer que as moléculas se ordenem, de maneira a reduzir a interação entre as caudas apolares e o meio hidrofílico. Uma vez atingida a concentração micelar crítica, ocorre à formação de micelas, e as moléculas do tensoativo passam a interagir entre si. Três interações são dominantes e determinam o número de moléculas ideal para a formação e o formato do agregado: repulsão entre os grupamentos polares, interações entre as cadeias apolares e entre as interfaces polar-apolar. A redução ou o aumento da concentração do solvente ou alteração da temperatura favorece a formação de diferentes sistemas tais como os líquido-cristalinos, as ME e as EM sendo que as interações intermicelares, associadas às interações entre as moléculas da micela e à geometria do tensoativo influenciam o tipo de sistema formado (GUSTAFSSON *et al.*, 1997).

O fator de empacotamento (**Pp**) é um parâmetro útil para prever a mesofase preferencialmente formada por um composto anfifílico, uma vez que relaciona o formato da molécula com propriedades que influenciam a curvatura da interface polar-apolar e, conseqüentemente, o tipo de agregado formado. O **Pp** pode ser calculado usando a seguinte equação (MITCHELL e NINHAM, 1981):

$$Pp = \frac{Vh}{a_o \times L}$$

sendo, **Pp** o fator de empacotamento, **Vh** volume da cauda hidrocarbonada, **L** o comprimento do anfílico e **a_o** à área da cabeça polar. A Figura 2 relaciona o parâmetro de empacotamento com os tipos de fases formadas.

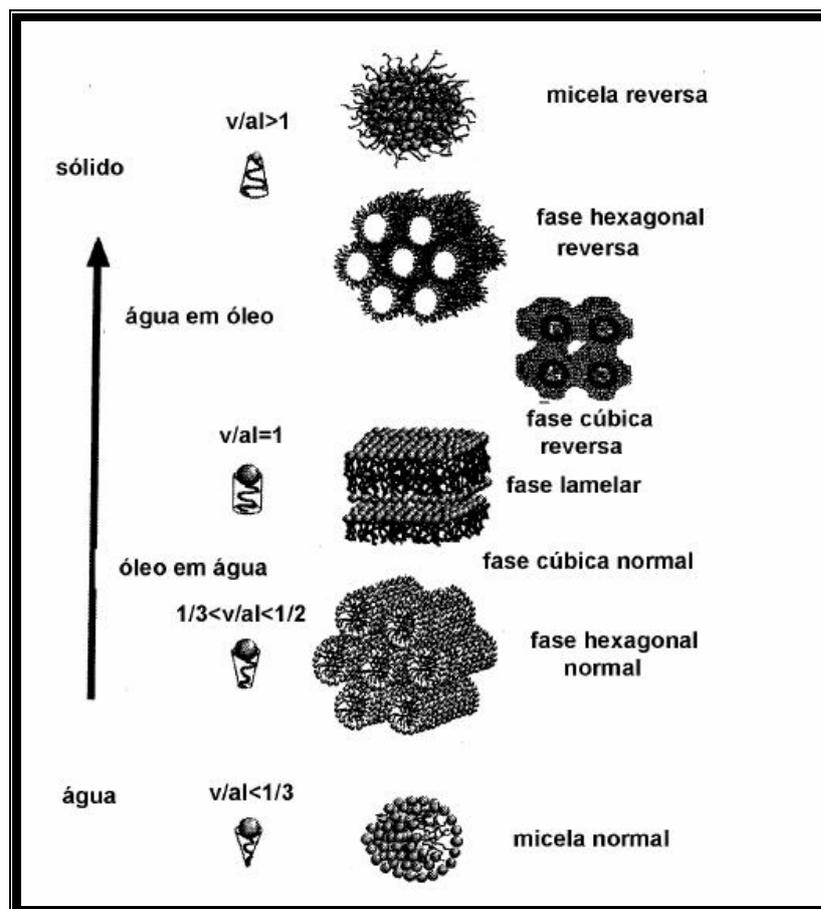


FIGURA 2: Seqüência idealizada de estruturas líquido-cristalinas, micelares e microemulsionadas formadas dependendo do parâmetro de empacotamento (ditado pela geometria da molécula), teor de água e temperatura, em que $Vh/a_o.L$ é o fator de empacotamento.

(BORNÉ *et al.*, 2001)

Os agentes tensoativos são substâncias caracterizadas pela presença de uma região polar e outra apolar em suas estruturas moleculares. Podem formar microemulsões do tipo água em óleo (A/O) ou óleo em água (O/A) ou estruturas bicontínuas (Figura 3), as quais são definidas, principalmente, pelo equilíbrio apresentado entre a parte polar e a apolar do

emulsificante empregado, denominado tecnicamente de Equilíbrio-Hidrófilo-Lipófilo (EHL). O EHL é numericamente representado em uma escala com valores que vão de zero a vinte, em função do tamanho da cadeia polar presente nas moléculas do tensoativo. Assim, valores inferiores a oito indicam predominância da parte apolar, tornando-as adequadas para o preparo de microemulsões A/O. Ao contrário, valores superiores a oito apontam a prevalência da região polar e o emprego dessas substâncias na obtenção de microemulsões O/A (ZANIN *et al.*, 2002). E valores iguais a oito apontam o processo de inversão de fases e, portanto a formação de microemulsões com estruturas bicontínuas, as quais contêm volumes relativos aproximadamente iguais entre a fase aquosa e oleosa (LAWRENCE e REES, 2000; FORMARIZ *et al.*, 2005).

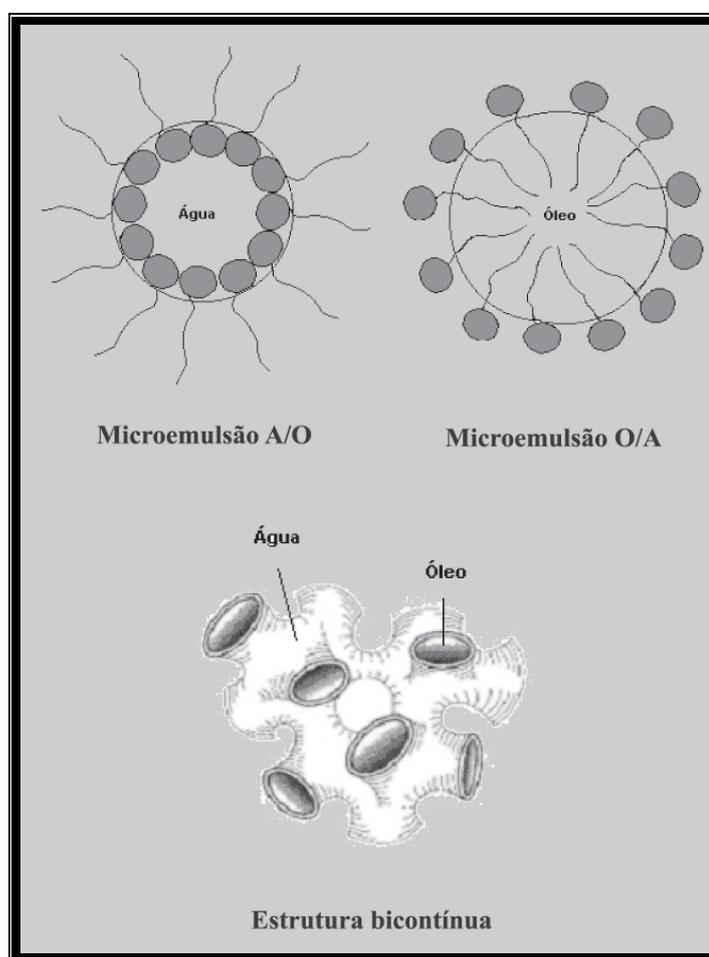


FIGURA 3 - Representação esquemática da organização das microemulsões.

(FORMARIZ *et al.*, 2005)

Os principais tensoativos utilizados no preparo de microemulsões são aqueles de natureza não iônica, como os copolímeros dos óxidos de etileno e propileno (“*poloxamers*”),

polissorbatos e polietilenoglicóis (PEG). Os tensoativos iônicos são geralmente tóxicos para utilização em microemulsões destinadas à aplicação parenteral, principalmente se considerar a elevada concentração necessária dessas substâncias para a estabilização da grande área de interface formada entre as fases oleosa e aquosa (CUNHA-JÚNIOR *et al.*, 2003). Entre os principais representantes dos grupos de tensoativos citados, destaca-se a utilização do óleo de rícino polioxil- 40 - hidrogenado (Eumulgin HRE[®] 40) (FORMARIZ *et al.*, 2006), poloxamer 188, do polissorbato 80 e do PEG 200 devido, principalmente, à baixa viscosidade apresentada por estes, o que contribui com a praticidade do processo de preparação do sistema e não influencia significativamente nas propriedades reológicas do produto obtido (CUNHA-JÚNIOR *et al.*, 2003).

Microemulsões com tamanho de gotículas da fase interna na faixa de 100-200nm, administradas por via endovenosa, geralmente são rapidamente removidas da circulação sanguínea pelo sistema fagocítico mononuclear (SFM). Dessa forma, a presença de polioxietileno nos sistemas microemulsionados ajuda a evitar que as ME sejam rapidamente removidas da circulação (LEE *et al.*, 1995; LIU e LIU, 1995). Esse procedimento prolonga a meia vida plasmática do fármaco, permitindo o direcionamento passivo para os pulmões, rins, e áreas de inflamação (LEE *et al.*, 1995).

Os tensoativos de natureza anfótera, como os fosfolídeos (principalmente, a fosfatidilcolina de soja [Epikuron[®]200]) (Figura 4), apresentam baixa toxicidade e são substâncias utilizadas de maneira corriqueira na produção de microemulsões lipídicas injetáveis como, por exemplo, em formulações destinadas à nutrição parenteral e quimioterapia. Elas estão entre os principais tensoativos utilizados no preparo de microemulsões. Entretanto, na utilização dessas substâncias é necessário observar o grau de pureza por elas apresentado, pois suas propriedades físicas e tensoativas dependem da composição e da concentração dos fosfolídeos e dos ácidos graxos presentes em cada amostra (VANDAMME, 2002).

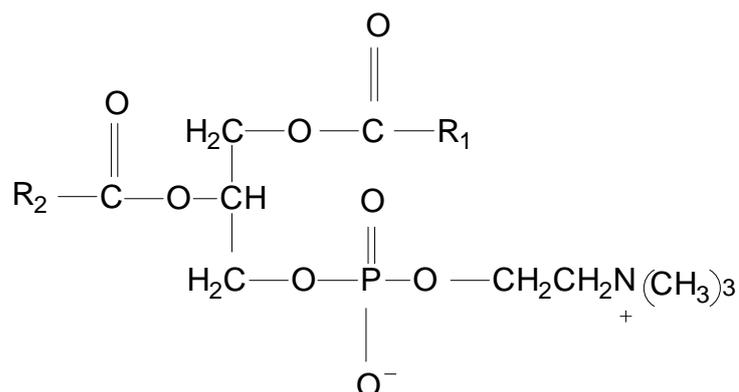


FIGURA 4: Estrutura química da fosfatidilcolina.

Em que R_1 e o R_2 , são ácidos graxos, o quais podem ser diferentes ou idênticos.

B) Co-tensoativos

Os co-tensoativos são responsáveis pela redução adicional da tensão interfacial necessária para a formação e estabilidade termodinâmica das microemulsões, além de promoverem fluidificação do filme interfacial formado pelo tensoativo, impedindo na maioria das vezes a elevação da viscosidade do sistema obtido (CUNHA-JÚNIOR *et al.*, 2003).

Os principais co-tensoativos utilizados no preparo de microemulsões são álcoois e glicóis de baixa massa molecular e que apresentam uma cadeia carbônica entre dois e dez carbonos. Uma avaliação criteriosa da toxicidade do co-tensoativo a ser empregado no preparo de uma microemulsão é considerada de fundamental importância na elaboração de uma formulação desse tipo de sistema, tendo em vista que essas substâncias podem apresentar efeitos irritantes significativos, como por exemplo, os álcoois de baixa massa molecular (CUNHA-JÚNIOR *et al.*, 2003).

Assim, o co-tensoativo mais utilizados em preparações farmacêuticas injetáveis destinadas à nutrição parenteral e quimioterapia é o oleato de sódio (Figura 5) (FORMARIZ *et al.*, 2006; FAMAP, 2008). Esse tensoativo é classificado como um tensoativo do tipo aniônico possui EHL igual a 18, e é utilizado como agente solubilizante (LACHMAN *et al.*, 2001).

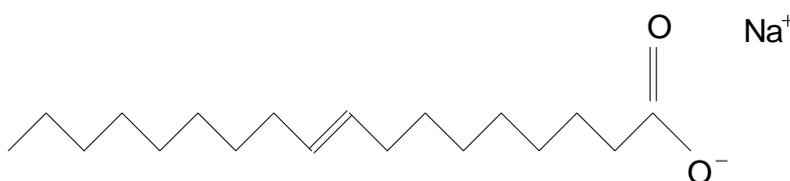


FIGURA 5: Estrutura química do oleato de sódio.

C) Fase oleosa

Os principais parâmetros relacionados com a escolha da fase oleosa a ser empregada no preparo de uma microemulsão estão relacionados, principalmente, à possibilidade de obtenção do próprio sistema e das características de solubilidade do fármaco a ser veiculado (CUNHA-JÚNIOR *et al.*, 2003).

Os óleos de elevada cadeia carbônica não permitem a obtenção de microemulsões e aqueles de natureza menos apolar (triglicérides, principalmente) permitem a dissolução de maiores concentrações de fármacos lipossolúveis. Assim, entre os principais óleos estudados, destaca-se o triglicerídio de cadeia longa (TCL) de origem vegetal, o triglicerídio de cadeia média (TCM) que tem sido utilizado sozinho ou em combinação com o TCL (TROTTA *et al.*, 2002), o miristato de isopropila, o óleo de soja e o Myglyol[®] 812 (triésteres de glicerol dos ácidos cáprico e caprílico). O grau de pureza destes óleos deve ser elevado, no sentido de prevenir a ocorrência de irritação que pode ser provocada pelos contaminantes presentes em óleos com baixa pureza (CUNHA-JÚNIOR *et al.*, 2003).

A literatura também mostra o efeito do colesterol (colest-5en- 3 β -ol) (Figura 6) como fase oleosa nas propriedades estruturais e termodinâmicas de microemulsões lipídicas (STIDDER *et al.*, 2005). Os resultados mostraram que o aumento da concentração de colesterol no sistema favorece a sua cristalização, ocorrendo na forma de bicamadas lamelares, levando a uma estrutura com menor mobilidade (STIDDER *et al.*, 2005). Entretanto, quando a concentração de colesterol excede o limite de solubilidade na bicamada lipídica, a deposição de cristais de colesterol é observada (LOOMIS *et al.*, 1979). Dessa forma, dependendo da proporção colesterol/tensioativo fases líquido-cristalinas isotrópicas e anisotrópicas podem existir uma vez que esses agregados podem originar diferentes microestruturas, tais como fases cúbicas, hexagonais e lamelares, além de cristais de colesterol (BRINON *et al.*, 1999; EZRAHI *et al.*, 1999; EPAND *et al.*, 2000; 2001; FARKAS *et al.*, 2001). Essas várias formas de agregação do colesterol podem influenciar diferentemente a velocidade de liberação dos fármacos antitumorais neles incorporados (FORMARIZ *et al.*, 2007; 2008).

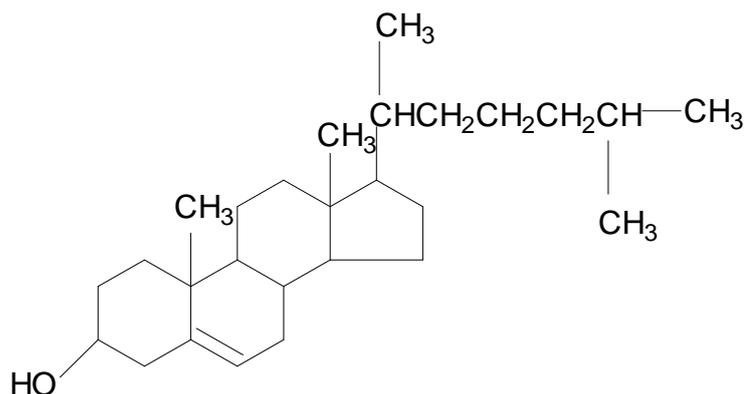


FIGURA 6: Estrutura química do colesterol.

Halbert e colaboradores (1984) incorporaram agentes antineoplásicos lipossolúveis em sistemas microemulsionados lípidicos, a partir da mistura de agentes citotóxicos lipossolúveis em lipoproteínas de baixa densidade (LDL) que é o maior carreador de colesterol no plasma humano. É uma partícula esférica, com aproximadamente 200Å de diâmetro, a qual apresenta, em seu interior, ésteres de colesterol circundados por uma monocamada de fosfolípido e colesterol livre. Esses carreadores apresentam grande potencial de direcionamento de fármacos antitumorais, pelo fato que as células tumorais durante o processo de divisão celular requerem grande quantidade de colesterol para síntese da membrana celular, resultando no aumento da expressão de receptores de LDL (LDLr) (FORMARIZ *et al.*, 2004).

Neste contexto, quando ocorre a incorporação de fármacos antitumorais nas gotículas de LDL rica em colesterol, estas irão liberar as citotoxinas para as células tumorais, produzindo um sistema de liberação específica de fármacos antitumorais, podendo aumentar o efeito antitumoral, reduzindo a toxicidade potencial do fármaco sobre as células normais (MARANHÃO *et al.*, 1994).

O uso do colesterol como fase oleosa pode modificar profundamente a velocidade de liberação de fármacos antitumorais, oferecendo benefícios que incluem o aumento da solubilidade e o direcionamento para sítios específicos, diminuindo a toxicidade e aumentando a eficácia clínica de fármacos (AZEVEDO *et al.*, 2005; PRETE *et al.*, 2006; DIAS *et al.*, 2007).

D) Fase aquosa

A literatura relata que na composição da fase aquosa pode ser necessária a adição de tampões e/ou agentes isotonzantes tendo como finalidade a obtenção e manutenção de um pH favorável garantindo assim, o efeito terapêutico e a estabilidade do fármaco (CUNHA-

JÚNIOR *et al.*, 2003). Dessa maneira, utilizou-se como fase aquosa o tampão Tris-HCl 0,01M pH 7,2 uma vez que a microemulsão utilizada irá ser aplicada pela via parenteral.

2.1.2 Preparo e caracterização das microemulsões destinadas à aplicação parenteral em oncologia

Na preparação das microemulsões, a construção de diagramas de fase pode ser uma ferramenta fundamental para caracterizar em que condições experimentais as ME existem e em que proporções dos componentes outras estruturas tais como EM e CL podem estar presentes. A partir desses dados, pode-se selecionar a região do diagrama de fases que mais convenientemente represente a condição mais apropriada para que o fármaco antitumoral seja incorporado (FORMARIZ *et al.*, 2005).

Os diagramas pseudoternários podem ser obtidos a partir de dados de titulação ou pela preparação de amplo número de amostras com diferentes proporções dos componentes. A vantagem do primeiro método é que este pode ser usado para estudar amplo número de amostras de diferentes composições de maneira rápida (BHARGAVA *et al.*, 1987; LAWRENCE e REES, 2000). Normalmente, os sistemas microemulsionados podem ser diferenciados visualmente dos outros sistemas, uma vez que os demais sistemas apresentam-se como emulsões líquidas opacas, emulsões géis opacas, representadas por sistemas de viscosidade elevada, ou com separação de fases. Já os sistemas microemulsionados líquidos são caracterizados como sistemas semi-transparentes ou opticamente transparentes (FORMARIZ *et al.*, 2005) e os sistemas géis são caracterizados como cristais líquidos.

É importante ressaltar, que após a seleção dos constituintes da formulação, um diagrama é construído, assumindo-se que as microemulsões são sistemas formados por três componentes: fase aquosa, fase oleosa e uma mistura de tensoativos (tensoativo/co-tensoativo), sendo que cada vértice do diagrama indica um destes componentes. Qualquer combinação dos constituintes pode ser representada como porcentagem no diagrama (CUNHA-JÚNIOR *et al.*, 2003).

Entretanto, devido à complexidade e ao longo tempo investido no preparo desses diagramas, o método da titulação com co-tensoativo pode ser utilizado (Figura 7). Neste método, pela adição da fase aquosa, fase oleosa e tensoativo é formada uma emulsão inicial de aspecto leitoso. Esse sistema é então titulado com o co-tensoativo até obtenção da microemulsão, caracterizada pelo aspecto transparente ou semi-transparente (CUNHA-JÚNIOR *et al.*, 2003).

Por outro lado, as microemulsões lípidicas ricas em colesterol usadas na terapia do câncer podem ser preparadas por irradiação de ultrassom, ou seja, pela técnica de sonicação (MARANHÃO *et al.*, 1992; FORMARIZ *et al.*, 2006) envolvendo alta energia a qual proporciona valores transientes negativos para tensão interfacial. Quando o fornecimento de energia é cessado o sistema tende ao equilíbrio energético caracterizado pela formação da microemulsão (MARANHÃO *et al.*, 1992; 1994; 2002; OLIVEIRA *et al.*, 2004; FORMARIZ *et al.*, 2006).

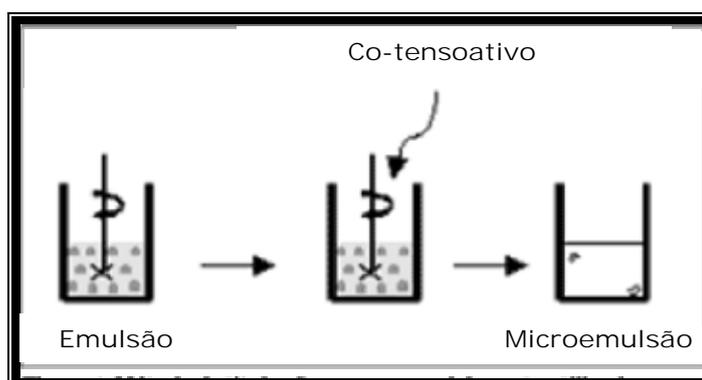


FIGURA 7: Método da titulação com co-tenssoativo utilizado para o preparo das microemulsões.

(CUNHA-JÚNIOR *et al.*, 2003).

Um sistema de classificação que define os vários equilíbrios existentes entre a microemulsão e as fases aquosa e oleosa foi proposto (WINSOR, 1948). Foram estabelecidos quatro tipos de sistemas:

1) *Winsor I* - É representado pelo equilíbrio entre a fase emulsionada com a fase oleosa em excesso. Por possuir densidade menor que a da emulsão, a fase oleosa posiciona-se acima da emulsão;

2) *Winsor II* - Representa o equilíbrio entre a fase emulsionada e a fase aquosa em excesso. Por possuir densidade menor que a da fase aquosa, a emulsão posiciona-se na parte superior à fase aquosa;

3) *Winsor III* - Existem três fases em equilíbrio, óleo, emulsão e água, em que o óleo é a fase superior, a emulsão a fase intermediária e a água, a fase inferior;

4) *Winsor IV* - É um sistema em que apenas existe a fase microemulsão, isto é, um sistema visualmente monofásico. A Figura 8 mostra detalhes do sistema de Winsor.

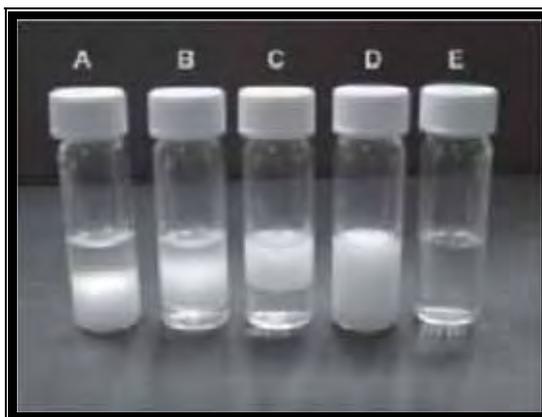


FIGURA 8 - Representação da classificação de Winsor. A) Winsor I. B) Winsor III. C) Winsor II. D) Emulsão homogênea. E) Winsor IV.

(FORMARIZ *et al.*, 2005)

Contrária a facilidade de preparação, a caracterização da microestrutura desses sistemas requer a aplicação de técnicas sofisticadas de análise, diferentes das utilizadas rotineiramente (LAWRENCE e REES, 2000). Algumas propriedades físicas são de obtenção relativamente simples, em que se utilizam medidas de densidade, viscosidade, espalhamento de luz, índice de refração, condutividade e tensão superficial. Entretanto, para caracterização da natureza isotrópica, são utilizadas técnicas de microscopia de luz polarizada, espalhamento de raios-X a baixo ângulo (SAXS), espalhamento de nêutrons a baixo ângulo (SANS), ressonância magnética nuclear (RMN), dispersão dinâmica, estática e eletroforética da luz, difração de raios-X, microscopia eletrônica de criofractura, difração de nêutrons, calorimetria exploratória diferencial (DSC) e microscopia eletrônica, técnicas nem sempre disponíveis com facilidade (CUNHA-JÚNIOR *et al.*, 2003; FORMARIZ *et al.*, 2005).

2.1.3 Microemulsões lipídicas como nova perspectiva de tratamento do câncer

Nas últimas décadas, numerosos estudos demonstraram que a biodisponibilidade de um fármaco no organismo pode ser modificada pelo uso de nanocarreadores. O objetivo principal dos trabalhos empregando nanotecnologia farmacêutica consiste em obter sistemas de liberação prolongada de medicamentos mais eficazes e menos tóxicos com maior especificidade para tecidos alvos. Microemulsões contendo lecitinas na superfície e ricas em colesterol são propostas como carreadores de fármacos. Os trabalhos apresentam caráter multidisciplinar o qual associa a físico-química interfacial que fornece suporte no estudo da estabilidade de nanosistemas terapêuticos e a farmacologia que permite o estudo farmacocinético e biodisponibilidade dos produtos farmacêuticos. Fármacos encapsulados em

nanosistemas são utilizados para o tratamento do câncer. Inovações consistem na utilização de microemulsões para solubilização de fármacos com diferentes propriedades físico-químicas no tratamento do câncer (MARANHÃO *et al.*, 1994; 2002; VALDULGA *et al.*, 2003; AZEVEDO *et al.*, 2005; FORMARIZ *et al.*, 2006; DIAS *et al.*, 2007).

A literatura mostra que quando os fármacos são incorporados em sistemas microemulsionados, o transporte é maior do que em cristais líquidos. Esse fato pode ser atribuído às diferenças estruturais desses sistemas, os quais restringem o movimento das moléculas do fármaco, e às interações soluto-solvente no ambiente anisotrópico e isotrópico, visto que os cristais líquidos apresentam alta energia de ativação de difusão de fármacos e baixa difusividade de fármaco (GABBOUN *et al.*, 2001; FORMARIZ *et al.*, 2005).

Maranhão e colaboradores, em 1993, demonstraram que uma microemulsão lipídica (LDE) com composição semelhante à LDL humana, com exceção da parte protéica, ao ser injetada na circulação plasmática, entra em contato com as lipoproteínas naturais, adquire Apo E, que é reconhecida pelo receptor da LDL. A Apo E serve para LDE ligar-se ao receptor, sendo captada para o interior da célula (Figura 9).

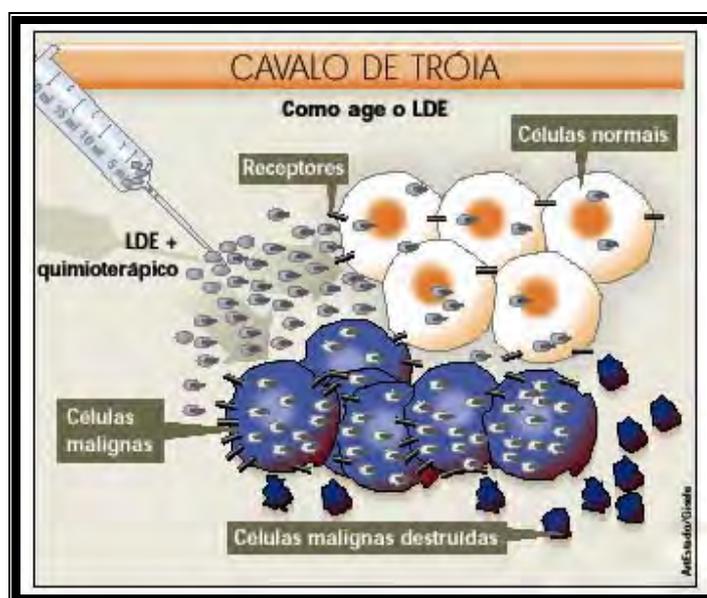


FIGURA 9: Mecanismo de ação das microemulsões denominadas de LDE nas células tumorais e normais.

(MARANHÃO, 2001)

Essa hipótese foi inicialmente comprovada em pacientes com leucemia mielocítica aguda (LMA). Verificou-se que a LDE foi removida com velocidade muito maior nos pacientes com LMA do que nos controles. Em contrapartida, após os pacientes serem tratados

com esquemas quimioterápicos convencionais e atingido completa remissão da doença, a remoção plasmática da LDE tornava-se mais lenta, normalizando-se. Isto mostrava que as células de LMA, com receptores em número muito maior, provocaram remoção acelerada desta ME. Quando estas foram destruídas pela quimioterapia, a remoção era normalizada. Neste trabalho, também se demonstrou a captação da LDE pela medula óssea infiltrada de célula de LMA de maneira direta, por meio de imagens de Medicina Nuclear obtidas com LDE marcada com Tecnécio^{99m}. Neste experimento comprovou-se que 70% da LDE injetada foi captada pelas células leucêmicas (MARANHÃO *et al.*, 1994).

Neste contexto, microemulsões lipídicas ricas em colesterol do tipo O/A são alternativas interessantes como sistemas de liberação de fármacos antitumorais. A estrutura básica da microemulsão lipídica é um lipídio neutro na região interna, como, por exemplo, um triglicerídio líquido, estabilizado por lipídios anfifílicos, como os fosfolipídios. Esse sistema pode solubilizar quantidade considerável de fármacos lipossolúveis no domínio hidrofóbico da fase interna oleosa (LUNDBERG *et al.*, 1996; FORMARIZ *et al.*, 2005).

Em 1997, Cortesi e colaboradores, utilizaram os sistemas microemulsionado lipídicos para solubilizar a Camptotecina, um alcalóide citotóxico bastante utilizado no tratamento de paciente com câncer, em especial pulmão, ovário e mama. A solubilidade desse fármaco é muito baixa, cerca de 1,3mg/mL. Isto causa sério inconveniente aos pacientes, uma vez que este medicamento só pode ser administrado, através de infusões contínuas ou múltiplas injeções diárias, o que resulta em vários efeitos adversos: neutropenia, trombocitopenia, anemia, alopecia, náusea, vômitos, diarreia e erupções cutâneas.

Os sistemas microemulsionados lipídicos aumentaram consideravelmente a solubilidade da Camptotecina, pois esta chegou a 500mg/mL. Esse efeito, associado à maior penetração em membranas biológicas, pode contribuir para um aumento da absorção gastrointestinal dos alcalóides e então facilitar a administração oral (CORTESI e NASTRUZZI, 1999).

Recentemente, confirmou-se a captação e a concentração da LDE em tumores sólidos. Estudos realizados em pacientes com câncer de ovário e de mama revelaram que a LDE concentrava-se mais nos tecidos tumorais. A captação, no câncer de ovário foi cerca de 10 vezes maior do que no tecido normal (ADES *et al.*, 2002). Por outro lado, no carcinoma de mama foi 4 vezes maior (GRAZIANI *et al.*, 2002). Estes experimentos comprovam, que é possível direcionar um veículo nanoestruturado para o tecido tumoral.

Estudos demonstram que a carmustina apresentou-se estável quando incorporada em LDE, além de minimizar a toxicidade em ratos. Já através dos estudos de incubação de

linhagens neoplásicas e de células normais, pode-se verificar que sua atividade citotóxica foi preservada (MARANHÃO *et al.*, 2002).

Em seguida, avaliou-se a ação terapêutica do complexo LDE – carmustina, na dose de 180mg/m² de superfície corpórea, em um grupo de pacientes com melanoma múltiplo ainda não tratados. Os resultados mostraram que os níveis de imunoglobulina M secretada pelas células do mieloma, decresceram em mais de 60%, sem que tenham ocorrido efeitos colaterais importantes, além da melhora clínica dos seis pacientes (HUNGRIA *et al.*, 2004).

Em 2003, Valdurga e colaboradores, avaliaram a associação de etoposide com LDE quanto à estabilidade físico – química, a atividade citotóxica e toxicidade em ratos. Demonstraram que esta associação era estável, com preservação da atividade citostática do fármaco, além de baixa toxicidade em animais.

A estabilidade da associação de etoposide a uma microemulsão lipídica rica em colesterol também foi avaliada em mulheres com carcinoma de ovário, mostrando que a maior parte do fármaco mantém-se nas gotículas da ME até a remoção da circulação e a internalização pelas células. Além de apresentar maior concentração no tecido ovariano neoplásico do que no tecido normal (AZEVEDO *et al.*, 2005).

Posteriormente, ocorreu à associação de paclitaxel a LDE. Esta mostrou toxicidade menor e aumento da atividade antitumoral do fármaco quando testada em modelo murino de melanoma B16. Nesse estudo também, investigou-se os parâmetros farmacocinéticos do oleato de LDE-paclitaxel e a habilidade da LDE de concentrar o fármaco no tumor em oito pacientes com neoplasia do trato genital feminino. Os resultados mostraram que a taxa de remoção fracionária (FCR) de LDE e da associação LDE-paclitaxel eram similares. A FCR do oleato de paclitaxel associado à LDE foi menor do que do paclitaxel comercial. A meia vida plasmática e a área sob a curva (AUC) do LDE-paclitaxel foram maiores do que as do paclitaxel comercial. A quantidade de LDE-paclitaxel e de LDE no tumor foi respectivamente, 3,6 e 3,5 vezes maior do que nos tecidos normais. A associação a LDE parece ser uma alternativa no tratamento dos tumores ginecológicos (DIAS *et al.*, 2007).

A literatura mostra que a incorporação da DOX em microemulsões lipídicas ricas em colesterol é dependente do valor de pH sendo possível a incorporação de até 2,24mg/mL de DOX (FORMARIZ *et al.*, 2006). Os resultados também mostraram que o perfil de liberação de DOX “*in vitro*” quando veiculadas em ME é mais prolongado principalmente quando a fração de colesterol aumenta (FORMARIZ *et al.*, 2007; 2008). Além desses sistemas preservarem a atividade antiproliferativa da DOX em culturas de células “*in vitro*”

(FORMARIZ, 2004). Assim, essas ME podem ser utilizadas como nanocarreadores de fármacos na terapia do câncer.

O futuro das microemulsões na terapia do câncer para liberação prolongada de fármacos na área oncológica parece ser promissor. O estudo de fármacos antitumorais encapsulados em microemulsões abriu a possibilidade do desencadeamento de respostas antitumorais com níveis plasmáticos adequados com apenas uma única dose injetável, a qual seria equivalente ao uso de várias doses, em razão da liberação lenta e/ou programada dos fármacos. Esforços para aumentar o índice terapêutico dessas moléculas têm sido substancialmente direcionados no sentido do desenvolvimento de sistemas de liberação específicos. As microemulsões lipídicas ricas em colesterol tem proporcionado amplas oportunidades para novas formulações e sistemas de liberação para grande variedade de substâncias difíceis de formular, tais como o paclitaxel, etoposide, camptotecina, carmustina, doxorubicina, entre outros (CORTESE *et al.*, 1997; CORTESE e NASTRUZZI, 1999; MARANHÃO *et al.*, 2002; VALDULGA *et al.*, 2003; HUNGRIA *et al.*, 2004; AZEVEDO *et al.*, 2005; FORMARIZ, 2004; DIAS *et al.*, 2007).

O desenvolvimento de microemulsões lipídicas ricas em colesterol quando associadas aos fármacos antitumorais como, por exemplo, a doxorubicina pode proporcionar um incremento de sua eficácia com redução de sua toxicidade e a um custo extremamente menor que lipossomas ou outros complexos lipídicos de custo elevado, disponíveis no mercado internacional.

2.1.4 Doxorubicina como modelo de fármaco antitumoral utilizado na terapia do câncer

Muitos quimioterápicos têm sido amplamente utilizados na prática da quimioterapia. Os antibióticos obtidos por fermentação natural, derivados de várias espécies do gênero *Streptomyces*, estão entre estes quimioterápicos. Alguns antibióticos atuam como citocidas levando as células neoplásicas a morte e outros agem como citostáticos interferindo no crescimento celular (ALTIERI, 2001; ASHIKAWA *et al.*, 2004).

O cloridrato de doxorubicina (DOX) é um antibiótico antineoplásico do grupo das antraciclinas (Figura 10), isolado a partir de culturas fúngicas de *Streptomyces peucetis var. caesi*, relatado como de uso corrente em oncologia humana (SILVA e CAMACHO, 2005). Ela apresenta um anel de antraciclina em sua estrutura que se intercala entre os pares de nucleotídeos da dupla fita de DNA nas fases de transcrição e replicação. Produz radicais livres altamente reativos, que conseqüentemente lesam a membrana celular e o DNA, induzindo

De acordo com Lorenzo e colaboradores (2002), Mathiasen e Jaattela (2002), uma via de indução de apoptose pela DOX é através da inibição de Bcl-2 e da liberação do citocromo c, com ativação das caspases 3 e 9 sugerindo o envolvimento mitocondrial.

Recentemente Wang e colaboradores (2004) observaram apoptose em adenocarcinoma ovariano e neoplasias gliais, pela ação da DOX, através da ativação da caspase 3 e pela ação da proteína p53.

Clinicamente, a DOX tem atividade significativa contra considerável número de tumores, incluindo alguns que são geralmente refratários a outros fármacos. A DOX tem sido usada com êxito para produzir regressão em várias neoplasias (tumores malignos), tais como carcinoma da mama, pulmão, bexiga, tireóide e ovariano; sarcomas ósseos e dos tecidos moles; linfomas de Hodgkin e não-Hodgkin; neuroblastoma; tumor de Wilms; leucemia linfoblástica aguda e leucemia mieloblástica aguda. Esse fármaco tem proporcionado resultados positivos nos tumores superficiais da bexiga por administração intravesical (aplicação dentro da bexiga) após ressecção do tumor por via transuretral. Outros tumores sólidos têm respondido também, mas o estudo destes até o presente momento é muito limitado para justificar indicações específicas (BAPTISTA, 2005).

A DOX é considerada um dos agentes mais ativos disponíveis para o tratamento quimioterápico do câncer e é parte importante de regimes curativos utilizados como adjuvante para o tratamento da doença em estádios precoces. A eficácia, entretanto, está associada a reações adversas que incluem granulocitopenia, náusea, vômitos, alopecia, reações de extravasamento, estomatite e cardiotoxicidade (BAPTISTA, 2005) mesmo respeitando-se a dose terapêutica e o intervalo de aplicação recomendados.

No homem, o risco de cardiomiopatia grave e irreversível aumenta se a dose cumulativa máxima de 550 mg/m² for excedida. As alterações patológicas e funcionais induzidas por antibióticos antraciclínicos no coração assemelham-se às da cardiomiopatia dilatada e incluem degeneração miocárdica com fibrose e inflamação, insuficiência miocárdica e dilatação cardíaca. A síndrome que resulta do efeito cardiotóxico da doxorubicina é caracterizada, clinicamente, por insuficiência cardíaca congestiva (ICC), hipotensão, anormalidades eletrocardiográficas, arritmias e morte súbita (SILVA e CAMACHO, 2005).

A lesão miocárdica induzida pela doxorubicina é caracterizada, histologicamente, por degeneração vacuolar sarcoplasmática, miocitólise, atrofia de miócitos e fibrose (SILVA e CAMACHO, 2005). Segundo Defrancesco e Hauck (2000), essas alterações seriam responsáveis pelo *déficit* de contratilidade, pelas arritmias e anormalidades

eletrocardiográficas. Essa lesão cardíaca também pode ser caracterizada por aumento significativo dos níveis séricos do biomarcador creatinina kinase (CKMB) (SAAD *et al.*, 2001).

A literatura também mostra que a DOX induz a lesão hepática e essa é conseqüência da indução de alterações peroxidativas em vários tecidos como, por exemplo, no fígado que é evidenciada pela elevação significativa na produção de malondialdeído (MDA) e pela depleção dos índices de glutathiona (GSH) nos tecidos do fígado dos ratos. Essa lesão hepática é caracterizada por aumento significativo dos níveis séricos dos biomarcadores alanina de aminotransferase (ALT) e aspartato aminotranferase (AST) (SAAD *et al.*, 2001).

Caso um antracíclico seguro e bem tolerado encontrado seja equivalente em eficácia à doxorrubicina, essa pode eventualmente ser substituída na maioria dos tratamentos para câncer. A doxorrubicina lipossomal peguilada (DLP) pode atingir este objetivo se estudos clínicos forem desenhados e executados apropriadamente e se provarem eficácia equivalente e melhor tolerabilidade. Quando se atinge a dose cumulativa de doxorrubicina de 550 mg/m² espera-se que 7,5% dos pacientes tratados desenvolvam sinais e/ou sintomas de insuficiência cardíaca congestiva (ICC), segundo dados de um estudo retrospectivo publicado (VON-HOFF *et al.*, 1979). Recentemente, uma análise de três estudos fase III realizada com 630 pacientes tratados com quimioterapia à base de antracíclicos (SWAIN *et al.*, 2003) mostrou que eventos cardíacos podem ocorrer em doses cumulativas mais baixas. Nesta análise retrospectiva, a porcentagem cumulativa de pacientes expostos à doxorrubicina que desenvolveram ICC foi de 5% com dose cumulativa de doxorrubicina de 400 mg/m², 26% com dose de 550 mg/m² e 48% com dose de 700 mg/m².

Dessa forma, a incorporação da DOX tanto em sistemas transportadores matriciais (nano e micropartículas entre outros) como em sistemas reservatórios (microcápsulas, lipossomas entre outros) é uma estratégia para reduzir a hepato e a cardiotoxicidade cumulativa dose-relacionada da DOX convencional.

2.1.4.1 Sistemas transportadores contendo doxorrubicina

Na última década, houve um aumento extraordinário no número de tecnologias viáveis para o controle da biodistribuição de DOX. Esse aspecto está sendo explorado, visando à obtenção de sistemas particulados sólidos ou sistemas com menor grau de organização, como as micelas, os niossomas, os lipossomas e as microemulsões lípidicas. Sistemas de direcionamento passivo de DOX com acúmulo em determinada região do tumor podem ser

desenvolvidos, devido às propriedades intrínsecas dos materiais ou dos próprios sistemas (FORMARIZ *et al.*, 2004).

Os sistemas transportadores de DOX, nos quais ligantes específicos permitem que materiais sejam direcionados para locais específicos do organismo, também, estão sendo estudados. As tecnologias de liberação discutidas a seguir, podem ser usadas para prolongar a meia vida da DOX e, mais importante, controlar a sua liberação na corrente circulatória. Alguns dos novos sistemas, como os lipossomas de DOX, estão sendo usados correntemente na clínica médica. Adicionalmente, outros sistemas como os de DOX associada a partículas poliméricas e, possivelmente, os sistemas microemulsionados lípidicos contendo DOX entre outros possuem enorme potencial de serem transformados em produtos comerciais (FORMARIZ *et al.*, 2004). A Figura a seguir mostra a representação esquemática de alguns sistemas transportadores de fármacos.

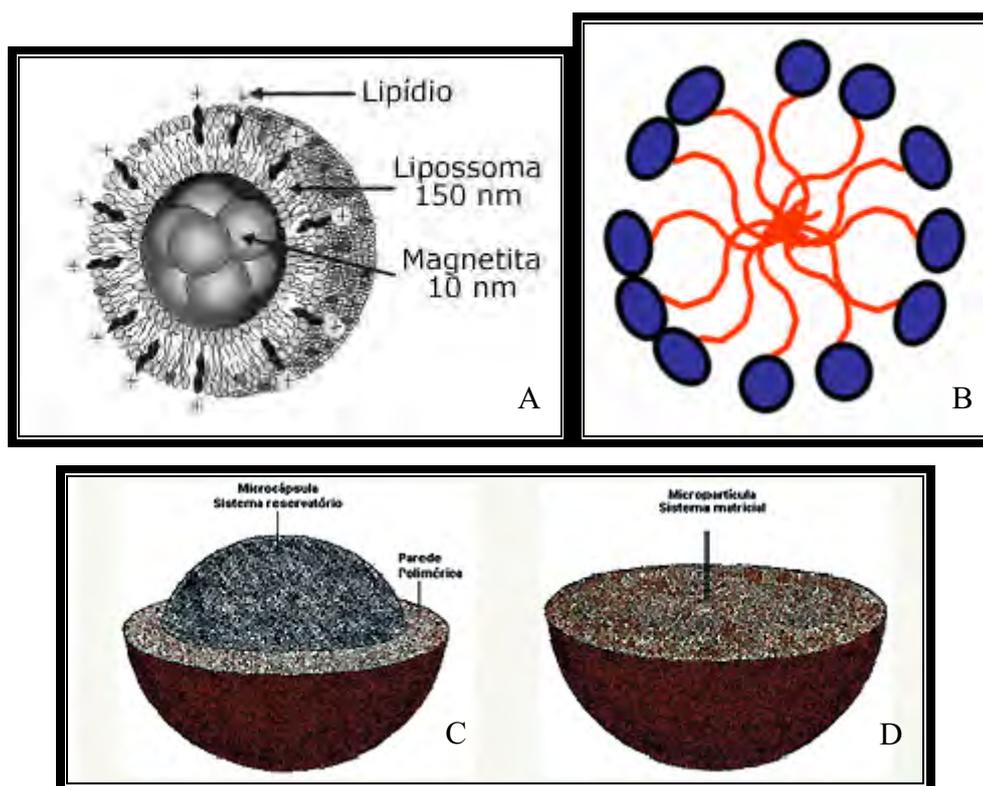


FIGURA 11: Representação esquemática de alguns sistemas transportadores de fármacos. A) Nanopartícula magnética encapsulada em lipossomas (SANTOS, 2007); B) Micelas (FORMARIZ *et al.*, 2004); C) Microcápsulas; D) Micropartículas (SILVA, 2004).

A) Lipossomas

Embora a indústria farmacêutica seja bem sucedida no descobrimento de novos fármacos citotóxicos que são candidatos em potencial para o tratamento do câncer, esta doença causa mais de seis milhões de mortes por ano em todo o mundo e este número continua crescente (ANDRESEN *et al.*, 2005; BATISTA *et al.*, 2007). A terapia com fármacos antineoplásicos tal como a DOX causa toxicidade sistêmica, resultando em citotoxicidade para as células normais. Parte das células cancerígenas tem características muito comuns com as células normais, das quais foram originadas. Deste modo, torna-se difícil encontrar um alvo único contra o qual o fármaco possa ser direcionado. Os efeitos colaterais associados à quimioterapia limitam a dose ou doses cumulativas administradas aos pacientes que podem levar a metástase do tumor e, muitas vezes, o desenvolvimento de resistência contra o fármaco (SAPRA e ALLEN, 2003; BATISTA *et al.*, 2007).

Uma estratégia alternativa para estes inconvenientes é o uso de lipossomas como carreadores de DOX, para alcançar a acumulação seletiva do fármaco no tecido, onde se encontra o tumor ou nas células tumorais. Carreadores lipossômicos têm sido aceitos clinicamente no tratamento do câncer, visto que eles alteram a farmacocinética e biodistribuição da DOX (MAMOT *et al.*, 2003; BATISTA *et al.*, 2007).

A encapsulação da DOX em lipossomas peguillados (Caelyx™/Doxil®, doxorubicina lipossomal peguillada [DLP]) é uma estratégia para reduzir a cardiotoxicidade cumulativa dose-relacionada da doxorubicina convencional (ALLEN e CHONN, 1987; GILL *et al.*, 1996). A tecnologia dos lipossomas possui aproximadamente 21 anos. A estrutura dos lipossomas é constituída de duas camadas lipídicas, e em seu interior encontra-se o fármaco de escolha. A diferença de DLP para os outros antracíclicos lipossomais é a cobertura da camada externa do lipossoma com polietilenoglicol (PEG), que confere a esta estrutura características únicas (GABIZON, 1994).

O PEG altera substancialmente a farmacocinética do lipossoma circulante à medida que evita a detecção e destruição da DLP pelo SFM, o que prolonga a meia-vida, que é de aproximadamente 72 horas (GABIZON, 1994; GABIZON e MARTIN, 1997). A DLP permanece encapsulada até atravessar os capilares fenestrados tumorais, atingindo altas concentrações no tecido tumoral. Quando comparada aos tecidos normais, esta tecnologia (GABIZON, 1994) aumenta preferencialmente a captação pelos tecidos tumorais como sarcoma de Kaposi e câncer de mama (SYMON *et al.*, 1999; LYASS *et al.*, 2000). Estudos pré-clínicos e clínicos, incluindo biópsia cardíaca (BERRY *et al.*, 1998; EARLY BREAST

CANCER TRIALISTS' COLLABORATIVE GROUP, 1998; SAFRA *et al.*, 2000), sugerem fortemente um perfil de favorável cardiotoxicidade para DLP se comparados com controles para DOX.

Dois aspectos referentes à DLP são importantes: a meia-vida prolongada de DLP altera a farmacocinética e altera o perfil de toxicidade comumente relacionado aos antracíclicos e com o aumento de concentração nos tecidos tumorais proporcionado pelo PEG espera-se que aumente a eficácia do fármaco (LYASS *et al.*, 2000).

Leucopenia, alopecia, náusea e vômitos não são os maiores problemas quando se opta por DLP; além disso, deve-se atentar para o fato de que a droga não é vesicante. As maiores toxicidades de DLP são estomatite e eritrodisestesia palmo-plantar (EPP), que são dose (estomatite) e intervalo (EPP) dependentes (GABIZON e MARTIN, 1997).

Caelyx™/Doxil® é equivalente à doxorubicina convencional e pode substituí-la no tratamento do câncer, exceto em regimes quimioterápicos de dose-densidade. Caelyx™/Doxil® é uma nova opção terapêutica para idosos, pacientes com risco cardíaco aumentado e expostos previamente aos antracíclicos e possui risco de cardiotoxicidade significativamente menor que a doxorubicina convencional (BAPTISTA, 2005).

Outros estudos também mostram o uso da DOX lipossoma encapsulado (Caelyx™/Doxil®) (THAMM *et al.*, 1997; POIRIER *et al.*, 2002). Neles, observou-se toxicidade renal da formulação encapsulada de DOX, levando os pesquisadores à diminuição da dose (de 1,5mg/Kg para 1mg/Kg) ou a escolha da DOX não encapsulada. Além disso, a DOX encapsulada em lipossoma apresenta outras desvantagens uma vez que o produto tem que ser reconstituído em Dextrose a 5% em água não garantindo que toda a quantidade de DOX seja ressuspendida e, portanto administrada. Esse produto reconstituído deve ser utilizado no prazo de 24 horas e o custo é elevado (SCHERING-SCHERING-PLOUGH, 2004), fato que limita o seu uso na terapia do câncer.

Lukyanov e colaboradores (2004) modificaram lipossomas de longa duração contendo DOX, comercialmente disponíveis como Doxil®, com anticorpos monoclonais que reconhecem antígenos da superfície do tumor, que não são encontrados em células normais. Um aumento da citotoxicidade desses lipossomas sítio-específicos foi constatado nos tumores.

Em 2005, Santos desenvolveu lipossomas lectina-conjugada, preparados a partir da conjugação da lectina Con A a lipossomas contendo DOX denominado de Con A-lipossoma-DOX. Os resultados mostraram a inibição de 70% e 50% da proliferação celular em linhagens humanas HEP-2 e NCI-H292, respectivamente enquanto a DOX em solução inibiu apenas 20% desses linhagens humanas. A encapsulação de DOX em Con A-lipossoma levou a um

melhoramento na penetração do fármaco nas células tumorais, e como conseqüência ao aumento da citotoxicidade, especialmente em células HEP-2. A nanoencapsulação de fármacos anticancerígenos em lipossomas sítio-específico promove um aumento na eficácia do fármaco constituindo, portanto, uma forma potencial de administração de tais fármacos.

De fato, Sadzuka e colaboradores (2006) também confirmaram que lipossomas com superfície modificada com PEG contendo DOX, agente antineoplásico, apresentaram capacidade furtiva (longa circulação) e com acumulação do fármaco na área tumoral.

Em estudos recentes, Chou e colaboradores (2006), avaliaram a atividade da DOX encapsulada em lipossomas furtivos (Lipo-Dox[®]) em pacientes com carcinoma ovariano epitelial resistente à platina na dose de 45 mg/m² a cada quatro semanas. A eficácia do Lipo-Dox[®] foi constatada em câncer recorrente e platina-resistente. Um perfil de baixa toxicidade foi verificado com avaliação de parâmetros fisiológicos, bioquímicos e de imagem.

B) Microesferas, microcápsulas e nanopartículas

Desenvolvidas nos laboratórios da Faculdade de Farmácia da Universidade de Chatenay-Malabry por quinze anos, as microesferas e microcápsulas para quimioembolização são vetores de dimensões relativamente elevadas (100 a 800 µm) caracterizados por liberar uma substância antitumoral como, por exemplo, a DOX no seio do tumor. Os sistemas utilizados são maciços - microesferas - ou ocos - microcápsulas - contendo a DOX dissolvida ou dispersa no material constituinte destes sistemas. Os materiais utilizáveis são de natureza variável (cera, etilcelulose, ácido polilático, copolímeros do ácido lático e glicólico), biodegradáveis ou não (PUISIEUX e ROBLOT-TREUPEL, 1988).

As microcápsulas e microesferas são injetadas em porções sucessivas até obter a redução conveniente da circulação no seio da artéria a embolizar. Os vetores provocam deste modo uma necrose do tumor. A este efeito mecânico soma-se em seguida um efeito quimioterapêutico, devido à liberação da DOX no seio do tecido tumoral. Estes sistemas possuem a potencialidade de concentrar o fármaco no tecido doente e de desenvolver assim, sua eficácia. Deste modo, eles caracterizam-se também pelo efeito de reduzir a concentração do agente terapêutico em outros tecidos ou órgãos, reduzindo sua toxicidade (PUISIEUX e ROBLOT-TREUPEL, 1988).

Microesferas contendo DOX também têm sido desenvolvidas para administração subcutânea e intramuscular. A administração intramuscular e subcutânea de microesferas tem por objetivo atuar como sistema matricial no qual a DOX dispersa na matriz polimérica será liberada por tempo prolongado uma vez que o polímero será degradado lentamente e o

fármaco será liberado por difusão ou erosão. A velocidade de degradação do sistema é dependente da forma e do tamanho da partícula e do material utilizado (MALLERY *et al.*, 2000). Por outro lado, as microcápsulas administradas por essas mesmas vias têm por objetivo atuar como sistema reservatório no qual o fármaco como, por exemplo, a DOX se encontra em uma cavidade central envolta por uma membrana polimérica, a qual controla sua taxa de liberação (FIALHO e CUNHA-JÚNIOR, 2007).

As nano e micropartículas diferem estruturalmente dos lipossomas e niossomas, porque são preparadas, a partir de polímeros, gerando uma matriz sólida, ao invés de terem um compartimento aquoso central. Usualmente, são obtidas, através da precipitação de polímeros solubilizados em uma das fases de uma emulsão (SCHOLES *et al.*, 1993; SONG *et al.*, 1997; KISSEL *et al.*, 1996; FORMARIZ *et al.*, 2004).

Estes sistemas têm sido desenvolvidos visando inúmeras aplicações terapêuticas, sendo planejados, principalmente, para administração parenteral. Uma das áreas mais promissoras na utilização, principalmente das nanopartículas é a vetorização de fármacos antitumorais como a DOX, almejando uma distribuição mais seletiva da mesma e, assim, um aumento do índice terapêutico (SCHAFFAZICK *et al.*, 2003).

A tecnologia dos sistemas microparticulados foi avaliada em tumores experimentais, mas o elevado diâmetro das partículas nessas formulações somente permite a administração em algumas vias, limitando seu potencial. As micropartículas são geralmente administradas pelas vias intraperitoneal, intramuscular, subcutânea ou diretamente no órgão doente e, em razão de suas dimensões maiores (10-160µm), são somente usadas para uma liberação prolongada da DOX. A DOX é gradualmente liberada por erosão ou por difusão do interior das partículas. A velocidade de liberação pode ser aumentada, diminuindo-se o peso molecular do polímero e o tamanho das partículas e também pelo controle da natureza do polímero/co- polímero (FORMARIZ *et al.*, 2004).

Micropartículas de resina de troca iônica contendo cloridrato de DOX (CODDE *et al.*, 1993) mostraram-se superiores ao fármaco livre, quando administradas através da artéria hepática. Aumento da atividade antitumoral também foi verificado em animais depois da administração intraperitoneal de micropartículas de ácido poli-láctico contendo DOX (IKE *et al.*, 1991). Micropartículas também foram administradas diretamente no interior dos tumores sólidos aumentando a atividade antitumoral da DOX (WILLMOTT e CUMMINGS, 1987).

Por outro lado, devido ao seu tamanho reduzido, as nanopartículas podem ser facilmente administradas por via endovenosa e usadas para direcionar a DOX para um tecido ou órgão particular. Para facilitar o direcionamento para tecidos tumorais a presença de

polioxietileno na superfície da partícula ajuda a evitar que as nanopartículas contendo DOX sejam rapidamente removidas da circulação sanguínea pelo SFM, principalmente representado pelas células Kupffer do fígado e macrófagos do baço. Nanopartículas estericamente impedidas (furtivas ou invisíveis) podem ser preparadas por revestimento com polioxietileno solúvel ou usando dialquil polioxietilenos e fosfolipídios (FORMARIZ *et al.*, 2004).

O emprego potencial pode ser ilustrado pela publicação de Couvreur e colaboradores (1982), que utilizaram nanopartículas de polisobutirianoacrilato para desviar a DOX do músculo cardíaco, ao qual ela é particularmente tóxica. Em camundongos, a concentração cardíaca do produto encontra-se consideravelmente reduzida, quando a DOX está associada às nanopartículas.

Chiannilkulchai e colaboradores (1990) avaliaram a eficácia de nanopartículas furtivas contendo DOX após administração endovenosa, em um modelo de reticulosarcoma M5076, em camundongos. A eficácia do sistema foi verificada pela contagem de metástases e pelo ensaio de sobrevivência dos animais. Os autores avaliaram que o acúmulo de nanopartículas contendo DOX nas células de Kupffer criou um gradiente de concentração com uma difusão passiva e prolongada do fármaco livre através do tumor, resultando em uma elevada exposição das células neoplásicas ao fármaco.

A literatura também relata que a liberação de DOX incorporada a nanopartículas de poli(cianoacrilato de *iso*-butila), pode ser prolongada e dependente da taxa de erosão da partícula. Em outro estudo, a cinética de liberação de DOX conjugada quimicamente ao grupo carboxílico terminal do poli(ácido láctico-co-glicólico) (PLGA), através de uma ligação éster, foi sustentada, podendo ser controlada pela massa molar do polímero (SCHAFFAZICK *et al.*, 2003).

Relatos recentes demonstraram a atividade antitumoral da DOX em nanopartículas, além de comprovarem o aumento da eficácia e a redução da toxicidade de DOX quando veiculada nesses sistemas (BARRAUD *et al.*, 2005). Assim, essas nano e micropartículas podem ser utilizadas como nanocarreadores de DOX na terapia do câncer.

C) Sistemas magnéticos

O desenvolvimento de sistemas de liberação prolongada contendo DOX tem recebido grande atenção nas últimas décadas, sendo que um dos alvos de grande interesse estão sendo o estudo e desenvolvimento de partículas magnéticas como transportadores (CHANDY e SHARMA, 1996).

Em 1978, Widder e colaboradores, propuseram o conceito de carreadores magnéticos como “injetar um material encapsulado magneticamente suscetível, como uma matriz transportadora de fármaco, utilizando um magneto externo para direcionar a matriz ao sítio alvo. O alvo é afetado com uma força magnética suficiente para reter partículas no campo fluido, sendo assim uma partícula ideal poderia extravasar dentro do tecido e ser fisicamente retida”. O tamanho e a forma desses ligantes são decisivos para as propriedades magnéticas desses materiais uma vez que são responsáveis pela estrutura eletrônica dos íons metálicos, bem como, pela força das interações de cargas entre os centros metálicos (BORDINI, 2006).

A primeira microesfera utilizada para veicular a DOX foi a magnetita coloidal (Fe_3O_4) ligada a albumina. Estas microesferas foram capturadas magneticamente no sarcoma de Yoshida implantado em caudas de ratos. Este experimento demonstrou remissão total dos sarcomas com 0,5mg/Kg de DOX veiculada a essas partículas magnéticas, ao passo que a administração sistêmica de 5mg/Kg de DOX livre não teve efeito na remissão do tumor e prevenção das metástases. Porém, estas partículas nunca foram testadas em humanos (WIDDER *et al.*, 1983; RUDGE *et al.*, 2000).

Rudge e colaboradores (2000), observando a necessidade de avançar os estudos e divulgar a suscetibilidade magnética, propuseram a preparação, caracterização e avaliação do desempenho das partículas magnéticas utilizando carvão ativo combinado com ferro em pó para liberação de DOX. Neste estudo os autores relatam a capacidade de absorção destas microesferas, bem como ensaios de citotoxicidade e suscetibilidade.

Com o mesmo intuito, Goodwin e colaboradores (2001), prepararam partículas magnéticas de carboximetilcelulose (CMC) veiculadas a DOX (CMC-DOX) e avaliaram a toxicidade hepática em modelo suíno com tumor induzido. Os resultados mostraram que pequenas lesões encontradas no tecido hepático não foram significativas, e não foi detectada DOX livre no sangue periférico dos animais, sugerindo que o fármaco livre ficou ligado ao transportador no local aonde o mesmo foi aplicado.

Em uma pesquisa similar, Leakakos e colaboradores (2003), também desenvolveram partículas magnéticas contendo ferro e carvão ativo com a finalidade de prolongar e direcionar a liberação da DOX para o tecido tumoral. Os resultados mostraram que foi possível direcionar e prolongar a liberação de DOX em locais específicos na bexiga de suínos após a administração intravesical devido às propriedades magnéticas das micropartículas.

A encapsulação da DOX em nanopartículas magnéticas com diâmetro de 30nm é uma estratégia para aumentar a meia vida e a biodisponibilidade do fármaco e reduzir a hepatotoxicidade que é dose-dependente. A aplicação dessas nanopartículas magnéticas

promoveu o aumento da concentração da DOX no órgão alvo (pulmões), e a prostração no fígado quando comparado a DOX livre (MYKHAYLYK *et al.*, 2005).

Em 2006 e 2007, Silva e colaboradores, relataram a praticabilidade da encapsulação direta da DOX as partículas magnéticas através da técnica de sonicação ou vórtex. Os resultados sugerem que a complexação do ferro com o fármaco é o mecanismo responsável para que a DOX seja encapsulada as nanopartículas magnéticas.

A eficácia da terapia antitumoral pode então ser melhorada aumentando a concentração local da DOX quando a biodistribuição sistemática do fármaco e os efeitos tóxicos puderem ser limitados (BARRATT, 2000). Dessa forma, uma possível aplicação desse material magnético é a preparação de sistemas de liberação prolongada de fármacos pouco solúveis, como a DOX uma vez que a literatura apresenta alguns exemplos de biopolímeros contendo ferro que são utilizados para esse propósito (GOODWIN *et al.*, 2001).

A literatura mostra a ausência de genotoxicidade e citotoxicidade em nanopartículas magnéticas (NPM) respectivamente, pelo teste de micronúcleo e porcentagem de eritrócitos policromáticos. A análise histopatológica realizadas em três tecidos mostrou poucos agregados de NPM em pulmões e baço, e nenhum no fígado. Alterações morfológicas não foram encontradas neste tecido durante o período experimental. Os raros infiltrados inflamatórios observados após tratamento no fígado e nos pulmões também foram vistos nos camundongos *Swiss* fêmeas controles. Testes bioquímicos realizados no sangue mostraram alterações irrelevantes, uma vez que as concentrações de alanina aminotransferase (ALT), fosfatase alcalina (FA), uréia e creatinina foram constantes em quase todos os tempos após administração das nanopartículas de maghemita recobertas com citrato encapsuladas em lipossomas (ML-Magh), sugerindo ausência de danos renais e hepáticos. A determinação dos níveis de ferro sérico mostrou que as ML-Magh não alterou significativamente os níveis de ferro, exceto em testes com o dobro (200µL) da concentração usual. Os dados sugerem que a ML-Magh é biocompatível e tem potencial para ser usadas em aplicações biomédicas, especialmente com agentes antineoplásicos na terapia do câncer, por meio da magnetohipertermia ou sistemas de liberação de fármacos (COELHO, 2008).

D) Iontoforese

A literatura mostra que o uso de promotores de absorção e/ ou a aplicação de corrente elétrica (iontoforese) nas formulações podem aumentar a penetração da DOX levando a uma concentração terapêutica desta na pele e, assim, permitindo que tumores cutâneos sejam tratados com sucesso por uma forma não invasiva e que apresente menos efeitos colaterais (TAVEIRA, 2007).

A quimioterapia tópica pode ser um tratamento alternativo para o tratamento de tumores cutâneos, com diminuição da toxicidade sistêmica. Dessa forma, Herai (2004) estudou a penetração iontoforética da DOX e o resultado mostrou que a iontoforese aumentou não só a retenção, mas também a permeação do fármaco através da pele.

Em um trabalho realizado por Taveira (2007), foi avaliada, a permeação iontoforética da DOX em formulações semi-sólidas como géis além da citotoxicidade destas formulações em cultura de células de melanoma com e sem a aplicação de corrente elétrica de baixa intensidade. Os resultados do estudo de liberação da DOX das formulações (gel de hidroxietilcelulose (HEC), gel de quitosana e solução aquosa) mostrou que o gel de quitosana possuiu uma velocidade de liberação quase três vezes maior do que das demais formulações. Os estudos de permeação passiva mostraram que o fármaco não atravessa a pele em quantidades detectáveis. No entanto, a iontoforese contribui significativamente não só na permeação da DOX, mas também na sua retenção cutânea. O gel de HEC foi o que apresentou uma maior retenção cutânea do fármaco em comparação com as demais formulações. Nos estudos de citotoxicidade realizados em células de melanoma (B6F10) em camundongos, verificou-se que as formulações contendo DOX possuíram citotoxicidade maior comparadas ao controle (solução de DOX). Isso significa que os componentes de cada formulação contribuem no poder de citotoxicidade contra as células de melanoma.

Esse estudo também mostrou que a solução de monoleína 5% em propilenoglicol apresentou maior atividade citotóxica dentre todas as formulações estudadas. Seus componentes, monoleína e propilenoglicol contribuem sinergicamente para sua atividade citotóxica, a qual é de aproximadamente 90% quando a concentração de DOX é de 20 ng/mL. Enquanto que em solução de DOX sua citotoxicidade é de aproximadamente 34% na mesma concentração. A aplicação de 0,1 a 0,5 mA/cm² de corrente elétrica não causou morte significativa para as células de melanoma quando aplicada por um período de 10 a 60 minutos. A citotoxicidade das formulações com e sem aplicação de corrente elétrica por 10 minutos não apresentaram diferença significativa. Porém, a aplicação de 20 minutos de corrente elétrica aumentou significativamente a citotoxicidade da DOX em solução aquosa. Conclui-se, resumidamente, que a aplicação de corrente elétrica de baixa intensidade aumentou a penetração da DOX através da pele e auxiliou a entrada do fármaco nas células tumorais, quando esta é dissolvida em solução aquosa (TAVEIRA, 2007).

As maiores desvantagens do transporte de fármacos por iontoforese são os riscos de queimaduras e choques resultantes da utilização de correntes elétricas elevadas e por longos períodos. Os riscos de queimadura podem ser causados por fatores como o contato dos

eletrodos com a pele, sobredosagem, presença de lesões no local de aplicação, alterações significativas de pH e elevada intensidade da corrente (FIALHO E CUNHA-JÚNIOR, 2007).

Por meio da iontoforese é possível potencializar a administração cutânea da DOX e atingir os tecidos alvos. Porém, esta técnica não é um sistema de liberação prolongada e não dispensa a necessidade de repetição do tratamento.

E) Micelas poliméricas

Copolímeros anfífilos de bloco, como os Pluronic (copolímeros de bloco de polioxietileno polioxipropileno) se auto-organizam em micelas poliméricas (BATRAKOVA *et al.*, 1996; FORMARIZ *et al.*, 2004). Com o objetivo de liberação, a DOX pode ser solubilizada no interior hidrofóbico das micelas (FORMARIZ *et al.*, 2004) ou alternativamente, conjugado com o polímero formador das micelas (YOKAYAMA *et al.*, 1990).

Entretanto, micelas são muito dinâmicas com relação à contínua troca das unidades de monômeros entre a estrutura da micela e as unidades livres em solução. Micelas de ácido poliaspártico são suficientemente estáveis no bloco para alterar a farmacocinética da DOX solubilizada, proporcionar períodos prolongados de circulação pelo organismo e liberar concentrações maiores de DOX no tecido tumoral quando comparado com a liberação da DOX livre (YOKAYAMA *et al.*, 1990; BATRAKOVA *et al.*, 1996; FORMARIZ *et al.*, 2004).

A solubilização da DOX em micelas de Pluronic aumentou a atividade antitumoral deste fármaco (BATRAKOVA *et al.*, 1996) e micelas formadas por copolímero de bloco a partir de ácido poli-aspártico-polioxietileno, ligando covalentemente a DOX ao final da cadeia do ácido poliaspártico reduz a toxicidade da DOX “*in vivo*”. (YOKAYAMA *et al.*, 1990).

F) Niossomas

Os niossomas possuem a mesma estrutura que os lipossomas, mas são formulados com tensoativos não-iônicos e outros tensoativos sintéticos. O sucesso obtido com os lipossomas estimulou a procura de outros tipos de vesículas formadas por compostos anfífilos. Tensoativos não-iônicos foram uma das primeiras alternativas de materiais estudados e foi descoberto um grande número de compostos capazes de se autoassociar, formando bicamadas fechadas às quais podem ser usadas para liberação de fármacos (FORMARIZ *et al.*, 2004)

como, por exemplo, a DOX. Niossomas contendo DOX acumulam no interior de tumores de maneira similar aos lipossomas (ROGERSON *et al.*, 1988; UCHEGBU *et al.*, 1995).

De fato, a encapsulação DOX em niossomas (ROGERSON *et al.*, 1988; UCHEGBU *et al.*, 1995) aumenta a liberação do fármaco no tumor e a atividade antitumoral. Ao contrário dos lipossomas furtivos, niossomas de DOX de 800nm de diâmetro, contendo um triglicerol (UCHEGBU *et al.*, 1995) ou de 200nm contendo ácido murâmico na superfície (UCHEGBU, 1998) não são capturados significativamente pelo fígado. Entretanto, os niossomas contendo triglicerol acumulam no tumor (ROGERSON *et al.*, 1988), enquanto que os de ácido murâmico acumulam no baço (UCHEGBU, 1998).

Por outro lado, niossomas de DOX de 200nm com polioxietileno (peso molecular 1000) na superfície são rapidamente capturados no fígado (UCHEGBU *et al.*, 1995) e acumulam em menor extensão no tumor. Parece óbvio que para sistemas coloidais administrados por via endovenosa, o tempo de permanência na corrente circulatória pode ser controlado por alterações químicas na superfície do sistema particulado (FORMARIZ *et al.*, 2004).

A DOX foi preparada conjugando-se o fármaco antitumoral com uma cadeia polimérica via espaçador enzimaticamente degradável (DUNCAN, 1992). A encapsulação desses fármacos poliméricos em niossomas com cerca de 200nm proporcionou um sistema de depósito para o fígado, a partir do qual o fármaco ativo vai sendo obtido por clivagem e o nível de fármaco no fígado permanece por um período de mais de 24 horas (UCHEGBU e DUNCAN, 1997).

Com base na revisão bibliográfica apresentada, a utilização de sistema de liberação que promovam a diminuição dos efeitos colaterais da DOX representa uma alternativa viável para o tratamento sistêmico de várias neoplasias como carcinomas, linfomas, neuroblastomas e leucemias. Dentre os diversos sistemas de liberação considerados, as ME lipídicas rica em colesterol podem ser destacadas, em decorrência das suas propriedades físicas e químicas já discutidas. Além desse nanocarreador apresentar grande potencial de direcionamento de fármacos antitumorais.

III. OBJETIVO

3.1. OBJETIVO GERAL:

O presente trabalho tem o seguinte objetivo geral:

- Desenvolver um sistema terapêutico nanoestruturado microemulsionado, tendo a Doxorubicina como fármaco antitumoral, capaz de servir como sistema nanocarreador.

3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

O presente trabalho tem como objetivos específicos:

- Caracterizar as propriedades físico-químicas de sistemas microemulsionados, por meio da associação de Óleo de Ricino 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 para a incorporação do fármaco antitumoral Doxorubicina.
- Avaliar a toxicidade aguda (DL_{50}) em ratos *Wistar* e camundongos *Swiss*, via intraperitoneal, da doxorubicina incorporada em microemulsões contendo oleato de sódio e microemulsões sem oleato de sódio e comparar com a forma farmacêutica convencional (Cloridrato de Doxorubicina, Eurofarma, Brasil).
- Avaliar os parâmetros bioquímicos marcadores de cardiotoxicidade e hepatotoxicidade da doxorubicina incorporadas em microemulsões contendo oleato de sódio e microemulsões sem oleato de sódio e comparar com a forma farmacêutica convencional (Cloridrato de Doxorubicina, Eurofarma, Brasil).
- Avaliar a atividade antitumoral “*in vivo*” utilizando o modelo de Tumor Ascítico de Erlich (TAE) em camundongos *Swiss*, via intraperitoneal, da doxorubicina incorporada em microemulsões contendo oleato de sódio e microemulsões sem oleato de sódio e comparar com a forma farmacêutica convencional (Cloridrato de Doxorubicina, Eurofarma, Brasil).

IV. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 MATERIAL

4.1.1 MATÉRIAS-PRIMAS, REAGENTES, SOLUÇÕES E SOLVENTES

- Ácido clorídrico, Synth, Brasil;
- Ácido oléico, Synth, Brasil;
- Álcool comercial;
- Água deionizada Milli Q;
- Colesterol, Sigma-Aldrich, USA;
- Cloridrato de doxorrubicina, Eurofarma, Brasil (50mg de Cloridrato de doxorrubicina, 205mg de manitol e 250mg de lactose);
- Ficoll (Amershan Pharmacia[®], Uppsala Sweden);
- Fosfatidilcolina de soja (Epikuron[®] 200), Lucas Mayer, Alemanha;
- Hidróxido de sódio, PA-ACS, Grupo Química, Brasil;
- Oleato de sódio;
- Óleo de rícino polioxil-40-hidrogenado (Eumulgin[®] HRE40), Pharma Special, Brasil;
- Solução fisiológica estéril de NaCl 0,9%;
- Tris (hidroximetil)aminometano, Merck, Darmstadt, F.R. Germany;

4.1.2 EQUIPAMENTOS E VIDRARIAS

- Agitador magnético, P-Selecta, Multimatic-9S;
- Agulhas 25 x 7mm e 0,45 x 13mm;
- Analisador de partículas por Espalhamento de luz – Brookhaven Instruments Corporation, modelo EMI 9863 – fonte laser He-Ne 10mW, 532nm – HUGHES; Auto correlator 64 canais, instalado no Depto de Físico-Química, Instituto de Química – UNESP – Araraquara;
- Autoclave vertical, Phoenix;
- Balança analítica;
- 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;
- Espectrofotômetro de Iodo UV-VIS, Hewlett Packard, modelo 8453;
- Evaporador rotório, Marconi, modelo MA 120;
- Fluxo laminar Veco[®], Classe IIB;
- Filtros descartáveis para seringas, porosidade de 0,22 μ m, Corning[®] Corning Incorporated;
- Gaiolas de plástico medindo 34 x 50 x 16cm (largura x comprimento x altura);
- Gaiolas de plástico com área de 320 cm² e altura de 14 cm;
- Gerador de raios X de anodo rotatório – Rigaku – Denki;
- Homogeneizador de tubos, modelo AP22, Phoenix;
- Kit labtest (ref: 200404);
- Kit labtest (ref: 06004);
- Kit labtest (ref: 140404);
- Membrana de acetato de celulose 0,45 μ m - Sigma;
- 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 100 e 1000 μ L;
- Refratômetro de Abbe, Atago;
- Reômetro, Carri Méd, modelo CSL100, instalado no Depto de Físico-Química, Instituto de Química – UNESP – Araraquara;
- Seringas de 1, 3, 5 e 10mL;
- Sistema de purificação de água MILLIPORE, Milli-Q Plus;
- Sonicador, Sonics[®], Vibra-Cell;
- Ultracentrífuga HITACHI, modelo himac CP 80 β ;
- Ultra-som, Branson, modelo 1210;

4.2 MÉTODOS

4.2.1. PREPARAÇÕES DAS MICROEMULSÕES

Para um frasco transparente com tampa foram transferidas quantidades adequadas de tensoativo não iônico Óleo de Rícino Polioxil-40-Hidrogenado (ORPH) (Eumulgin[®] HRE 40), fosfatidilcolina de soja (FS) (Epikuron[®] 200) e Oleato de Sódio (OS). Para cada proporção de ORPH / FS/ OS (35:35:30 p/p) foi adicionado Colesterol (CHO) como fase oleosa e, em seguida, titulou-se com tampão Tris-HCl 0,01M, pH 7,2 (fase aquosa), sob agitação em vortex alternada com repouso. Essa seqüência de adição facilita a homogeneização da mistura, a qual foi sonicada usando Sonicador, Sonics[®], Vibra-Cell, com potência de 220 Watts, operando em modo descontínuo, por 20 minutos à temperatura ambiente. As microemulsões foram preparadas em triplicata.

Após sonicação, as microemulsões foram centrifugadas a 11.180 (x g) (Ultracentrífuga HITACHI, modelo himac CP 80 β) por 15 minutos, para eliminar os resíduos de titânio liberados pela haste do sonicador.

Em seguida, incorporaram-se 2mg/mL de DOX e esterelizou-se através de filtração em capela de fluxo laminar (Veco[®], Classe IIB) contínuo com membrana de acetato de celulose 0,22μm (Millipore).

Todos os materiais utilizados para preparação da microemulsão foram autoclavados em autoclave vertical (Phoenix) a 121⁰C, por 15 minutos.

4.2.1.1 Obtenção do oleato de sódio

Pesou-se cerca de 38g de Ácido Oléico, Synth, e transferiu-se para um funil de separação de 1000mL, em seguida adicionou-se hidróxido de sódio (NaOH) em excesso, agitou-se e mediu-se o pH que foi igual a 14. Após a verificação do pH, deixou-se a mistura em repouso por 30 minutos, filtrando-a por três vezes com 100mL de clorofórmio (CHCl₃). Mediu-se novamente o pH e este foi igual 6. Concentrou-se a amostra em um evaporador rotatório, Marconi, modelo MA 120, congelando-a em gelo seco. Após obtenção da amostra congelada, esta foi liofilizada para retirada da água (FORMARIZ, 2004).

4.2.2 COMPOSIÇÃO DOS SISTEMAS ESTUDADOS

Após ter obtido as microemulsões (FORMARIZ, 2004), estudou-se as ME descritas nas Tabelas 2 e 3.

TABELA 2. ME contendo Eumulgin® HRE40, FS e OS como mistura de tensoativos, Colesterol como fase oleosa e tampão Tris-HCl 0,01M pH 7,2 como fase aquosa e DOX.

<i>Fórmulas (%)</i>					
<i>Componentes</i>	<i>A₁</i>	<i>A₂</i>	<i>A₃</i>	<i>A₄</i>	<i>A₅</i>
FS	8,5	7	5	4	2,5
Eumulgin	8,5	7	5	4	2,5
Oleato de Sódio	1,5	3	5	6	7,5
Colesterol	1,5	3	5	6	7,5
Fase aquosa	80	80	80	80	80
[DOX] mg/mL	2	2	2	2	2

TABELA 3. ME contendo Eumulgin® HRE40 e FS como mistura de tensoativos, Colesterol como fase oleosa e tampão Tris-HCl 0,01M pH 7,2 como fase aquosa e DOX.

<i>Fórmulas (%)</i>					
<i>Composição</i>	<i>B₁</i>	<i>B₂</i>	<i>B₃</i>	<i>B₄</i>	<i>B₅</i>
FS	8,5	7	5	4	2,5
Eumulgin	8,5	7	5	4	2,5
Colesterol	3	6	10	12	15
Fase aquosa	80	80	80	80	80
[DOX] mg/mL	2	2	2	2	2

4.2.3 CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DAS MICROEMULSÕES SELECIONADAS

A partir das fórmulas descritas nas Tabelas 2 e 3 preparou-se 5g das ME, contendo EU/ FS / OS e EU/ FS como tensoativos, Colesterol como fase interna e tampão Tris-HCl 0,01M pH 7,2, como fase externa.

A caracterização física-química das ME foi determinada em função do volume de fase interna (fase oleosa) e da porcentagem de tensoativos, em que a proporção de fase aquosa foi mantida constante. As metodologias escolhidas para essa caracterização encontram-se descritas a seguir:

4.2.3.1 Propriedades reológicas

A reologia consiste no estudo do escoamento ou deformação do material em estudo quando submetido a uma tensão (WOOD, 1986). O método é aplicável na caracterização de sistemas microemulsionados, pois o comportamento do fluido está relacionado com o tipo e grau de organização do sistema (interações entre seus componentes). Também podem ser empregadas para avaliar a qualidade durante o processo de produção, além de permitir um estudo do efeito de aditivos na formulação (SCOTT, 2000; FORMARIZ *et al.*, 2005).

A quantidade de amostra utilizada foi de 1g de cada microemulsão e o equipamento empregado foi o reômetro Carri-Med, modelo CSL100, com sistema de cone (2^0) e placa, com espaçamento de $55\mu\text{m}$ na região central e com um diâmetro de 40mm. Durante o ensaio a temperatura foi mantida constante em $25 \pm 0,2^0\text{C}$ com o auxílio de um dispositivo “Peltier”. Os dados do segmento ascendente do gradiente de cisalhamento foram fitados em um modelo de leis de potência utilizando o software Rheology Solutions (dados V1.1.7 da versão, TA instrumentos) para descrever as características de fluxo das ME.

A determinação do comportamento reológico foi realizada para as microemulsões selecionadas e apresentadas nas Tabelas 2 e 3, em função das quantidades relativas de fase interna oleosa, no caso o colesterol. O reômetro funciona pelo princípio de rotação, nos quais a amostra é cisalhada entre paredes interna e externa do porta-amostra cuja geometria usual compreende cone e placa. Nessa geometria, a amostra colocada sobre a placa é submetida a sucessivas velocidades de cisalhamento pela ação do movimento de rotação do cone. Dessa forma é possível construir o reograma tensão de cisalhamento (τ) versus velocidade de cisalhamento ($\dot{\gamma}$), a partir dos quais torna-se possível o cálculo da viscosidade dinâmica dos materiais. As relações que descrevem a tensão e velocidade de cisalhamento são (DICKINSON, 1992):

$$\dot{\gamma} = \omega / \alpha \quad \tau = 3M / 2\pi R^3$$

sendo, M o torque, ω a velocidade angular (rad.s^{-1}) e R e α são respectivamente o raio e o ângulo do cone.

A vantagem desta geometria é que não ocorre variação na tensão de cisalhamento através da amostra, porque a distância entre o cone e a placa é muito pequena (da ordem de dezenas ou centenas de microns), fazendo com que a tensão de cisalhamento seja praticamente uniforme por toda a amostra (TOKUMOTO, 1996).

Para determinação das propriedades reológicas, as leituras foram feitas no intervalo de 0 a 100s⁻¹ para a curva 1 (ascendente) e de 100 a 0s⁻¹ para curva 2 (descendente).

4.2.3.2 Determinação da evolução das curvas de fluência-relaxação

A determinação da compliância (fluência-relaxação) foi realizada a partir das microemulsões selecionadas e apresentadas nas Tabelas 2 e 3, em função das quantidades relativas de fase interna oleosa, o colesterol.

O ensaio de fluência consiste em submeter à amostra a uma tensão constante e medir a evolução da deformação com o tempo. Em seguida, a tensão é aliviada e mede-se a relaxação da deformação (KORHONEN, 2004).

Os ensaios viscoelásticos são baseados nas propriedades mecânicas dos materiais que exibem tanto propriedades de líquidos viscosos quanto de sólidos elásticos, isto é, são materiais viscoelásticos e o reograma apresenta os componentes devido à deformação elástica, viscosa e à combinação dos dois anteriores (KORHONEN, 2004).

A deformação elástica ocorre quando o material é submetido a uma tensão, e esse material deforma-se imediatamente, proporcionalmente à força aplicada, e mantém essa deformação constante enquanto a força permanecer atuante. Quando esta força é removida, após um tempo (**t**) a energia elástica armazenada no material é despreendida, e o material retorna imediatamente à forma original. Quanto ao escoamento viscoso, à aplicação de uma tensão gera deformação contínua e proporcional à força aplicada, entretanto, ao retirar a tensão o sistema não mostra nenhuma tendência em retornar a forma original. Esta transformação é irreversível, pois a energia envolvida é totalmente dissipada sob a forma de calor (GRAESSLEY, 1984; TRADOS, 1987).

O comportamento viscoelástico, sob a ação de uma tensão constante mostra uma deformação instantânea (devido à parte elástica) e uma deformação contínua (devido à parte viscosa). Quando a tensão é removida o componente elástico retoma sua forma original, enquanto o viscoso não mostra tendência em retornar ao seu estado original (GRAESSLEY, 1984; TRADOS, 1987).

Os ensaios foram realizados com uma tensão constante de 0,05 Pa, sendo que esta tensão aplicada é inferior ao ponto de escoamento para manter a integridade estrutural das amostras (Tabelas 2 e 3).

4.2.3.3 Ensaios oscilatórios dos sistemas microemulsionados

A técnica de oscilação requer mínima perturbação do material e fornece várias informações sobre sua estrutura. As frequências da ordem de MHz (ou superiores) estão

associadas ao estiramento ou deformação das ligações atômicas, enquanto no extremo, baixas frequências (Hz) estão relacionadas aos movimentos de estiramento ou deformação macromoleculares. Na oscilação a tensão varia como uma onda senoidal. A amplitude da onda senoidal é proporcional à tensão ou torque aplicado, e variando-se a frequência (ω), a velocidade com a qual o patamar da tensão sobe e desce é alterada (SEARS e ZEMANSKY, 1971; GRAESSLEY, 1984).

A relação de fase entre as ondas de tensão aplicada e a deformação resultante fornece informações sobre os tipos de resposta (elástica ou viscosa) da amostra. Uma resposta elástica é quando as duas ondas são superpostas, enquanto que a resposta de um fluido viscoso é quando as duas ondas não são superpostas. Uma resposta viscoelástica está entre esses dois extremos (SEARS e ZEMANSKY, 1971; GRAESSLEY, 1984).

O módulo de elasticidade complexo $G^*(\omega)$ é dado pela razão entre as amplitudes de tensão e deformação, sendo suas componentes real e imaginária os módulos de estocagem, $G'(\omega)$ e de perda, $G''(\omega)$, respectivamente (SEARS e ZEMANSKY, 1971; GRAESSLEY, 1984).

Os ensaios de oscilação foram realizados com uma tensão oscilatória constante de 0,5 Pa, sendo as medidas realizadas em função da frequência (Hz). A frequência foi variada de 0 a 36Hz.

4.2.3.4 Microscopia de luz polarizada

Uma das maneiras de classificar as fases líquido-cristalinas é determinar sua isotropia óptica, através da técnica de microscopia de luz polarizada. Sob um plano de luz polarizada, a amostra é anisotrópica se for capaz de desviar o plano da luz incidente e isotrópica se não desviar a luz. Mesofases lamelares e hexagonais são anisotrópicas, enquanto as cúbicas e microemulsões são isotrópicas (NORLING *et al.*, 1992; BRINON *et al.*, 1999; HYDE, 2001).

A microscopia de luz polarizada é uma técnica que permite a classificação quanto à isotropia e anisotropia dos sistemas, permitindo a diferenciação entre o tipo de estruturação. Assim, essa técnica foi utilizada para caracterizar a morfologia e a evolução das características estruturais das microemulsões após a incorporação do colesterol e da DOX no sistema.

O microscópio de luz polarizada é um microscópio comum, no qual a luz atravessa um sistema polarizador, que polariza as ondas luminosas em um único plano. O emprego de um feixe de luz polarizada permite estudar estruturas anisotrópicas e birrefringentes, quando

apresentam dois índices de refração diferentes, conforme a incidência da luz, e isotrópicas, quando as estruturas não modificam o plano de polarização (ARAÚJO, 2004).

A partir das fórmulas selecionadas (Tabelas 2 e 3), formulações recentemente preparadas sem e com DOX (2mg/mL) foram colocadas sobre lâmina de vidro, cobertas com lamínula e analisadas em microscópio (Jenamed 2, Carl Zeiss – Jena) sob luz polarizada.

4.2.3.5 Espalhamento de raio X a baixo ângulo (SAXS)

Dentre as técnicas acima citadas, o espalhamento de raios -X a baixo ângulo (SAXS) pela matéria foi utilizado tanto para caracterizar a morfologia e a evolução das características estruturais das microemulsões quanto para identificar as fases cristalinas formadas após a incorporação do colesterol e/ou da DOX no sistema.

As medidas de espalhamento de luz a baixo ângulo (SAXS) foram utilizadas no estudo das características estruturais das dispersões coloidais selecionadas e apresentadas nas Tabelas 2 e 3.

Ao irradiar uma amostra bifásica com a forma de uma plaqueta relativamente fina, com um feixe monocromático (luz visível, raios-X, nêutrons, elétrons), observa-se o espalhamento da radiação na vizinhança angular próxima a do feixe transmitido. No caso dos raios X a baixo ângulo, o espalhamento deve-se as heterogeneidades na densidade eletrônica do sistema. A dependência angular da intensidade espalhada está diretamente relacionada à densidade eletrônica através da transformada de Fourier. Considerando uma gotícula de tamanho e forma variada, a intensidade espalhada $I(\mathbf{q})$ é proporcional ao fator forma $P(\mathbf{q})$ desta gotícula: $I(\mathbf{q}) \propto P(\mathbf{q})$ (NIELSEN, 1993).

A curva de intensidade do feixe espalhado em função do vetor de espalhamento (\mathbf{q}) assume a forma da Figura 12, em que quatro regiões podem ser distinguidas. As regiões 1, 2 e 3 compreendem o domínio conhecido por espalhamento de raio-X a baixo ângulo, que fornece informações a respeito da morfologia e do tamanho das gotículas dispersas (ou de macromoléculas em solução) e também a respeito do mecanismo de crescimento e agregação dessas gotículas (CHIAVACCI, 1996).

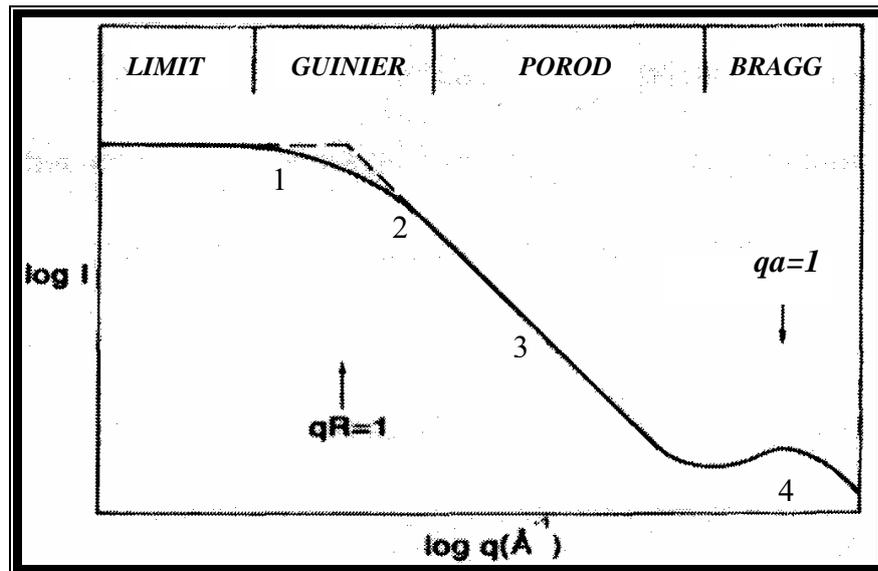


FIGURA 12: Diagrama esquemático das principais regiões das curvas de SAXS.

(URBAN, 2004)

No caso de um sistema diluído, em que as gotículas são globulares idênticas e orientadas ao acaso, a intensidade de espalhamento segue a Lei de Guinier (região 1) para pequenos valores de espalhamento q (GLATTER, 1982; CHIAVACCI, 1996):

$$I(q) = I(0) \exp\left(\frac{-R_g^3 q^2}{3}\right) \quad (1)$$

em que $I(q)$ é a intensidade do feixe de raios - X espalhado, $I(0)$ é a intensidade para q tendendo a zero e R_g é o raio de giro da gotícula. Dessa maneira, a partir do coeficiente angular da porção linear da curva $\ln I(q) \times q^2$ pode-se calcular o valor de raio de giro das gotículas.

Em um sistema concentrado, as gotículas espalhadoras são numerosas e interagem entre si e o espalhamento medido refletirá sua geometria e o arranjo entre elas. Para N gotículas idênticas, distribuídas ao acaso, a intensidade espalhada é escrita da seguinte forma (GLATTER, 1982; LECOMTE, 1988):

$$I(q) = N.P(q).S(q) \quad (2)$$

em que, $S(q)$ é o fator da estrutura do conjunto. Portanto, se as gotículas estão correlacionadas, $S(q)$ caracteriza o arranjo e contém todas as informações sobre as interações

entre as gotículas. Entretanto, $\mathbf{S}(\mathbf{q})$ pode assumir formas muito variadas, de acordo com o arranjo das entidades espalhadoras e é difícil separar as contribuições $\mathbf{P}(\mathbf{q})$ e $\mathbf{S}(\mathbf{q})$. De modo geral, quando a curva de espalhamento apresenta um máximo de espalhamento a baixos ângulos, pode-se relacioná-la com a presença de correlações entre as posições dos centros espalhadores. Pode-se deduzir uma distância média, \mathbf{d} , entre as gotículas vizinhas (ou dois planos vizinhos) a partir do valor da posição do máximo ($\mathbf{q}_{\text{máx}}$), empregando a relação (GLATTER, 1982; LECOMTE, 1988):

$$d = \frac{2\pi}{q_{\text{máx}}} \quad (3)$$

A razão entre a superfície da partícula espalhadora e o seu volume pode ser obtida independentemente do modelo adotado, através da relação (GLATTER, 1982; CHIAVACCI, 1996):

$$\frac{S}{V} = \frac{\pi K_p}{Q} \quad (4)$$

em que \mathbf{K}_p é a constante da Lei de Porod, que pode ser expressa por:

$$\lim_{q \rightarrow \infty} I(q)q^4 = K_p \quad (5)$$

Sistemas coloidais podem comportar-se como fractais (região 2) e neste caso a intensidade do feixe espalhado, na faixa de escala de comprimento entre o raio de giro da menor partícula geradora da estrutura (\mathbf{r}) e o raio de giro do agregado segue uma lei de potência (SCHAEFER e KAEFER, 1986; CHIAVACCI, 1996):

$$I(q) \approx q^{-\alpha} \quad (6)$$

A Lei de Porod (região 3) é observada quando o espalhamento é originado por uma superfície lisa e bem definida:

$$I(q) \approx q^{-4} \quad (7)$$

O interesse na utilização da técnica de SAXS na caracterização de sistemas nanoestruturados é explicado pelo fato de existir a possibilidade de exploração dos dados na determinação do tamanho médio e da distância entre os objetos espalhadores, como micelas e microemulsões. Além dessa técnica permitir avaliar a estrutura de objetos espalhadores mesmo que os mesmos não estejam organizados, ela permite caracterizar materiais que tem distância entre objetos espalhadores além do limite de trabalho da difração de raios-X (GLATTER, 1982; LECOMTE, 1988).

Essa técnica permite caracterizar partículas com tamanho entre 10 e 1000Å. Dessa forma, permite caracterizar uma grande variedade de amostras como proteínas, vidros e colóides (WILLIAMS, 1993).

A evolução estrutural das amostras (Tabelas 2 e 3) em função do teor da concentração de fase interna oleosa, no caso o colesterol e de tensoativo foi analisada por SAXS. Os dados foram coletados na estação de medidas D11-A SAS do Laboratório Nacional de Luz Síncrotron (LNLS) em Campinas, São Paulo - Brasil, que é equipada com um monocromador do tipo Si (111), com comprimento de onda do feixe de raio X de 1,608 Å. As amostras foram colocadas em uma cela termostaticada a 25°C.

O espalhamento do parasita (espalhamento de partículas existentes no sistema sem amostra) foi subtraído da intensidade total da amostra. As intensidades de todas as amostras foram medidas em unidades relativas, mas para uma comparação quantitativa, as medidas foram normalizadas nas mesmas condições experimentais.

Como o feixe de raio-X incidente é pontual no plano de detecção e na faixa de resolução do detector, não foi necessária realização de desconvolução das curvas de intensidade.

4.2.3.6 Difração de raios X

A difração de raios-X é fundamentada na condição de interferência construtiva estabelecida pela Lei de Bragg, observada na região 4 da Figura 12.

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):

$$2d_{hkl} \sin\theta = n\lambda, \quad n = 1,2,3 \quad (8)$$

em que d_{hkl} é a distância entre os planos de índice de Miller hkl , interplanar, θ o ângulo de difração de Bragg e λ o comprimento de onda de radiação incidente. Esta lei estabelece que para um dado comprimento de onda (λ) de radiação-X incidente, o raio refletido emergirá apenas em ângulos (θ) para os quais a relação acima é satisfeita. Cada pico de difração é produzido por um certo conjunto de planos que satisfaça esta condição. Como conjuntos semelhantes de planos estão dispostos no cristal de acordo com sua simetria, o arranjo dos pontos no padrão Laue reflete a simetria do cristal, permitindo a identificação do composto cristalino.

A identificação das fases cristalinas e a cristalinidade dos componentes das microemulsões selecionadas e apresentadas nas Tabelas 2 e 3, foram realizadas por difração de raio-X. Na coleta dos difratogramas foi utilizado um difratômetro de raio-X para policristais Siemens D- 5000, radiação $CuK\alpha$ monocromatizada por cristal grafite. A velocidade de varredura usada foi de 0,1 segundos a cada $0,05^\circ$ em um intervalo de 4° até 70° .

Os dados foram tratados usando-se o programa Winmetric[®] e o refinamento dos parâmetros cristalográficos foi feito a partir dos dados de difração (2θ e intensidade) da amostra (Tabelas 2 e 3) e dos dados cristalográficos de composto padrão tais como DOX, FS e Colesterol.

4.2.3.7 Determinação da estabilidade

A estabilidade das ME e da DOX-ME foram avaliadas em intervalos de tempos regulares até que surgissem sinais de instabilidade na preparação. As amostras (Tabelas 2 e 3) foram analisadas através de características macroscópicas, velocidade e crescimento do diâmetro das gotículas das ME, sendo que para essas duas últimas análises as técnicas utilizadas foram a espectrofotometria e a espectroscopia de fotocorrelação (PCS), respectivamente.

4.2.3.7.1 Características macroscópicas dos sistemas microemulsionados

A determinação da característica macroscópica foi realizada para as microemulsões selecionadas e apresentadas nas Tabelas 2 e 3.

Para as determinações da estabilidade “*shelf-life*”, formulações recentemente preparadas, formulações preparadas há 6 meses do experimento e formulações contendo 2mg/mL de DOX foram preparadas e deixadas à temperatura ambiente. Essas amostras

(Tabelas 2 e 3) foram colocadas em um frasco de vidro transparente para inspeção visual das formulações contra fundo escuro.

Fotografias foram tiradas imediatamente e após 6 meses da preparação, à temperatura ambiente ($25 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$), tendo como finalidade verificar modificações visuais nas características dos sistemas microemulsionados tais como, transição de fases de sistemas transparentes para semi-transparentes e/ou opacos e coalescência, estando esses fatores diretamente relacionados a estabilidade.

4.2.3.7.2 Ensaio cinético de crescimento das gotículas dos sistemas microemulsionados através de análise espectrofotométrica

O ensaio cinético dos sistemas microemulsionados (Tabelas 2 e 3) foi determinado por espectrofotometria na região do visível no comprimento de onda de 410nm visto que é nesse comprimento de onda que verifica-se a turbidez das amostras (FRANZINI, 2006).

Elaborou-se o gráfico da turbidez das respectivas amostras em função do tempo e da velocidade de crescimento das gotículas (v) em função da quantidade de fase oleosa, no caso o colesterol.

Para a determinação desse ensaio cinético preparou-se 5g das microemulsões selecionadas (Tabelas 2 e 3) sem e com DOX (2mg/mL) e em seguida 1mL das amostras foram diluídas em 10mL de tampão TRIS-HCl 0,01M pH 7,2 e cuidadosamente filtradas utilizando-se membranas de $0,45\mu\text{m}$, CORNING[®]. Em seguida, transferiu-se para cubetas de quartzo com capacidade de 5mL e 1cm de caminho óptico, e analisadas por um período de 15 dias por espectrofotometria na região do visível, $\lambda = 410\text{nm}$. A temperatura do sistema foi mantida a $25 \pm 0,1^{\circ}\text{C}$.

Foram realizadas 3 determinações da absorvâncias das ME selecionadas durante 15 dias.

4.2.3.7.3 Crescimento do diâmetro das gotículas dos sistemas microemulsionados através da espectroscopia de fotocorrelação (PCS)

A partir das formulações selecionadas (Tabelas 2 e 3), foram preparadas 5g das microemulsões sem e com DOX (2mg/mL) e em seguida 200 μL das amostras foram diluídas em 4mL de tampão TRIS-HCl 0,01M pH 7,2 e cuidadosamente filtradas utilizando-se membranas de $0,45\mu\text{m}$, CORNING[®] e analisadas em analisador de gotículas

BROOKHAVEN (Figura 13). As preparações foram mantidas em frascos de cintilação isentos de poeira.



FIGURA 13. Esquema do aparelho utilizado para determinação do diâmetro das gotículas por espalhamento de luz.

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° 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 20°C , o comprimento de onda do laser foi de 514nm e o índice de refração foi de acordo com o índice de cada amostra analisada.

O índice de refração das amostras (Tabelas 2 e 3) foi determinado utilizando-se Refratômetro de Abbé, ATAGO, aferido com água deionizada Milli-Q (índice de refração 1,3330), à temperatura de $20 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$.

Foram realizadas 10 determinações do diâmetro e índice de polidispersidade das gotículas, com a duração total de 5 minutos por 15 dias. A primeira análise foi realizada imediatamente após o preparo.

4.2.4 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 30/2005 em anexo (Anexo 8.3).

4.2.4.1 Casuística

Para a determinação da dose letal média (DL_{50}) das ME contendo doxorubicina foram utilizados ratos *Wistar* e camundongos *Swiss*, com peso médio de 250g e de 30g, respectivamente, provenientes do Biotério Central da Universidade Estadual Paulista-Unesp. Os animais foram transferidos para o biotério do Departamento de Princípios Ativos Naturais e Toxicologia 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 5 grupos de 5 animais cada, por grupo de tratamento. Os experimentos foram realizados na fase de claro (GUIDE FOR THE CARE AND USE OF LABORATORY ANIMALS, 1996).

4.2.4.2 Delineamento experimental

A) Experimento 1: Determinação da DL_{50} do Cloridrato da Doxorubicina

Vinte e cinco ratos *Wistar* e camundongos *Swiss* foram selecionados em função do peso e dispostos em 5 grupos de 5 animais, sendo um grupo controle e 4 grupos experimentais. Os animais do grupo controle receberam solução salina estéril (100mg/Kg) via intraperitoneal, e aqueles dos grupos experimentais (ratos *Wistar* e camundongos *Swiss* machos) receberam 7,5; 8; 10 e 15 mg/Kg e 5; 10; 20 e 30 mg/Kg, respectivamente de cloridrato de doxorubicina pela mesma via. A seguir, observou-se os sintomas apresentados pelos animais e/ou a morte dos mesmos durante 14 dias. A agulha utilizada para administração i.p. foi de 25 x 7mm (ratos) e 0,45 x 13mm (camundongos) (BIGHETTI *et al.*, 2004).

B) Experimento 2: Determinação da DL_{50} das microemulsões com Oleato de Sódio contendo Doxorubicina

Trinta e cinco ratos *Wistar* e camundongos *Swiss* foram selecionados em função do peso e dispostos em 7 grupos de 5 animais, sendo 2 grupos controles, 1 grupo para a administração do veículo e 4 grupos experimentais. Os animais do grupo controle negativo receberam uma solução salina estéril (100mg/Kg) via intraperitoneal. Já os animais do grupo

controle positivo receberam o cloridrato de doxorrubicina [9mg/Kg (ratos) e 12,25mg/Kg (camundongos)] via i.p., e aqueles dos grupos experimentais (ratos *Wistar* e camundongos *Swiss*) receberam 12; 15; 18 e 20mg/Kg e 35; 50; 60 e 70mg/Kg, respectivamente de microemulsões com oleato de sódio contendo doxorrubicina pela mesma via. Os animais do grupo veículo receberam as microemulsões sem fármaco na dose de 100mg/Kg via i.p.. A seguir, observou-se os sintomas apresentados pelos animais e/ou a morte dos mesmos durante 14 dias. A agulha utilizada para administração i.p. foi de 25 x 7mm (ratos) e 0,45 x 13mm (camundongos) (BIGHETTI *et al.*, 2004).

C) Experimento 3: Determinação da DL_{50} das microemulsões sem Oleato de Sódio contendo Doxorrubicina

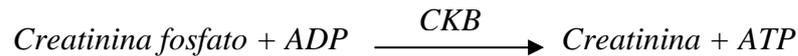
Trinta e cinco ratos *Wistar* e camundongos *Swiss* foram selecionados em função do peso e dispostos em 7 grupos de 5 animais, sendo 2 grupos controles, 1 grupo para a administração do veículo veículo e 4 grupos experimentais. Os animais do grupo controle negativo receberam uma solução salina estéril (100mg/Kg) via intraperitoneal. Já os animais do grupo controle positivo receberam o cloridrato de doxorrubicina [9mg/Kg (ratos) e 12,25mg/kg (camundongos)] via i.p., e aqueles dos grupos experimentais (ratos *Wistar* e camundongos *Swiss*) respectivamente 20; 25; 30 e 35mg/Kg e 20, 25, 40 e 70mg/Kg, respectivamente de micromulsões sem oleato de sódio contendo doxorrubicina pela mesma via. Os animais do grupo veículo receberam as microemulsões sem o fármaco na dose de 100mg/Kg via i.p.. A seguir, observou-se os sintomas apresentados pelos animais e/ou a morte dos mesmos durante 14 dias. A agulha utilizada para administração i.p. foi de 25 x 7mm (ratos) e 0,45 x 13mm (camundongos) (BIGHETTI *et al.*, 2004).

4.2.5 MÉTODOS ANALÍTICOS

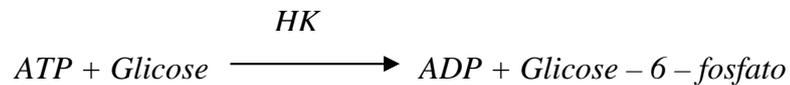
4.2.5.1 Determinação da atividade da isoenzima MB da creatinina kinase (CKMB)

A determinação de CKMB foi realizada por método cinético pela reação otimizada por Szasz e colaboradores (1976), Kit Labtest (ref:200404), cujas etapas estão descritas abaixo:

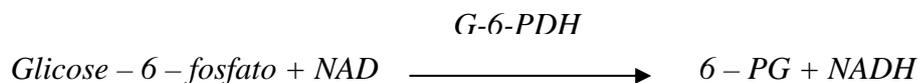
A amostra de soro foi incubada com o reagente de trabalho da isoenzima MB da creatinina kinase (CKMB) que contém um anticorpo específico para a subunidade CKM e que inibe completamente a atividade enzimática do monômero CKM. A atividade do monômero CKB, que não é inibida pelo anticorpo, é medida pela seguinte seqüência de reações:



A CK – B catalisa a desfosforilação da creatinina fosfato para produzir adenosina trifosfato (ATP).



Este ATP reage com a glicose na presença da hexoquinase (HK) formando glicose 6-fosfato.



A glicose 6 – fosfato na presença da glicose 6-fosfato desidrogenase (G-6-PDH) é oxidada a 6 – fosfogluconato (6-PG) e reduz o NAD a NADH. A velocidade de incremento na absorvância em 340nm é proporcional à atividade da CKB na amostra.

4.2.5.1.1 Procedimento:

Em um tubo rotulado teste pipetou-se 1mL do reagente de trabalho. Adicionaram-se 0,05mL de plasma contendo ME e DOX-ME (Tabelas 2 e 3), homogeneizaram-se e incubaram-se a 37⁰C durante 5 minutos. Transferiram-se para a cubeta termostatizada a 37⁰C e esperaram-se 30 segundos. Em seguida, realizaram-se a leitura da absorvância inicial (A₁), disparando-se simultaneamente o cronômetro. Repetiram-se a leitura após 5 minutos (A₂). A atividade da CKMB é dada pela seguinte equação:

$$\text{Atividade da CKMB (U/L)} = (A_2 - A_1) \times 1333$$

Esses resultados foram expressos como média ± erro padrão da média e analisados, empregando-se análise de variância (KRUSKAL – WALLIS ONE WAY – Analysis of Variance on Ranks), seguido do teste de Dunn's Method, tomando-se o valor de p < 0,05 como nível de significância estatística (SOKAL e ROLHF, 1981).

4.2.5.2 Determinação da atividade da aspartato amino transferase (AST)

A determinação da aspartato amino transferase (AST) ou transaminase glutâmico oxalacética (GTO) foi realizada por método cinético pela reação, Kit Labtest (ref: 06004), cujas etapas estão descritas a seguir:

A AST catalisa especificamente a transferência do grupo amina do ácido aspártico para o cetoglutarato, com formação de glutamato e oxalacetato, conforme mostra reação a seguir:



O oxalacetato é reduzido à malato por ação da malato desidrogenase (MDH), enquanto a coenzima NADH é oxidada à NAD.

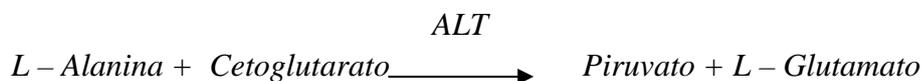


A redução da absorvância em 340nm, conseqüente à oxidação da NADH, é monitorada fotometricamente, sendo diretamente proporcional à atividade da AST na amostra.

4.2.5.3 Determinação da atividade da alanina amino transferase (ALT)

A determinação da alanina amino transferase (ALT) foi realizada por método cinético pela reação, Kit Labtest (ref: 140404), cujas etapas estão descritas abaixo:

A ALT catalisa especificamente a transferência do grupo amina da alanina para o cetoglutarato, com formação de glutamato e piruvato, conforme mostra reação a seguir:



O piruvato é reduzido a lactato por ação da lactato desidrogenase (LDH), enquanto a coenzima NADH é oxidada a NAD.



A redução da absorvância em 340nm, conseqüente à oxidação da NADH, é monitorizada fotometricamente, sendo diretamente proporcional à atividade da ALT na amostra.

4.2.5.3.1 Procedimento

Em um tubo rotulado teste pipetou-se 1mL do reagente de trabalho. Adicionaram-se 0,1mL de plasma contendo ME e DOX-ME (Tabelas 2 e 3), homogeneizaram-se e transferiram-se imediatamente para a cubeta termostatzada a $37 \pm 0,2$ °C e esperaram-se 1 minuto. Em seguida, realizaram-se a leitura da absorvância inicial (A_1), disparando-se simultaneamente o cronômetro. Repetiram-se a leitura após 2 minutos (A_2). A atividade da AST e da ALT é dada pela seguinte equação:

$$\text{Atividade da AST e ALT (U/L)} = (A_1 - A_2) / 2 \times 1746$$

Esses resultados foram expressos como média \pm erro padrão da média e analisados, empregando-se análise de variância (KRUSKAL – WALLIS ONE WAY – Analysis of Variance on Ranks), seguido do teste de Dunn's Method, tomando-se o valor de $p < 0,05$ como nível de significância estatística (SOKAL e ROLHF, 1981).

4.2.6 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTITUMORAL “IN VIVO”

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 31/2005 em anexo (Anexo 8.3).

4.2.6.1 Casuística

Para a determinação do potencial anticâncer “*in vivo*” das ME contendo doxorubicina foram utilizados camundongos *Swiss*, com peso médio 30g provenientes do Biotério Central da Universidade Estadual de Campinas - UNICAMP. Os animais foram transferidos para o biotério de Toxicologia e Farmacologia do Centro Pluridisciplinar de Pesquisa Química, Biológica e Agrícola – CPQBA/ UNICAMP, onde foram mantidos em condições controlada de temperatura (23 ± 1 ° 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 6 grupos de 9 animais cada, por grupo de tratamento. Os experimentos foram realizados na fase de claro.

4.2.6.2 Tumor Ascítico de Ehrlich

O teste para avaliação do potencial anticâncer “*in vivo*” da doxorubicina incorporadas em microemulsões contendo oleato de sódio e microemulsões sem oleato de sódio foi realizado usando-se o modelo de Tumor Ascítico de Ehrlich (TAE) (VICENT e NICHOLLS, 1967). As células de TAE foram descongeladas, ressuspensas em tampão PBS e centrifugadas por 5 minutos a 2.340 (x g) a 4°C. O sobrenadante foi descartado e o precipitado celular novamente ressuspensado em PBS, em volume suficiente para que cada animal recebesse 1.10^5 células numa proporção de 10 mL/Kg (via intraperitoneal). Dois animais receberam essas células e foram considerados doadores, e após sete dias foram sacrificados por deslocamento cervical, seu líquido ascítico foi coletado e submetido a processamento, dado que a quantidade celular agora era muito maior que a inoculada.

Para 2 mL de líquido ascítico coletados foram adicionados 2 mL de ficoll (Amersham Pharmacia[®], Uppsala, Sweden) e a mistura centrifugada a 2.340 (x g) por 15min a 18°C. O anel celular formado foi coletado e submetido à nova centrifugação, nas mesmas condições, após ser ressuspensado em PBS. O sobrenadante foi descartado e o pellet livre de hemáceas e células brancas foi ressuspensado em salina 0,9%, em quantidade suficiente para a inoculação de 1.10^5 células/0,5mL em cada animal via subcutânea.

Os animais foram monitorados e o tratamento foi iniciado, sempre pela via intraperitoneal, com 9 animais por grupo assim que o tumor sólido tornou-se evidente (aproximadamente 8 dias). Os animais foram divididos nos seguintes grupos: salina 0,9% (veículo) (10mL/Kg) como controle negativo, doxorubicina (5 mg/Kg) como controle positivo, microemulsões sem fármaco (10mL/Kg) como controle negativo da doxorubicina veiculada no sistema e cloridrato de doxorubicina incorporada em microemulsão com e sem oleato de sódio nas respectivas doses: 2,5; 5 e 10mg/Kg. O tratamento foi realizado a cada 7 dias e o tempo total de observação do experimento foi totalizado em 15 dias. Após os 15 dias de experimento, os animais foram eutanaziados e o tumor retirado, pesado e medido. Esses resultados foram expressos como média \pm erro padrão da média e analisados, empregando-se análise de variância (KRUSKAL – WALLIS ONE WAY – Analysis of Variance on Ranks), seguido do teste de Dunn’s Method, tomando-se o valor de $p < 0,05$ como nível de significância estatística (SOKAL e ROLHF, 1981).

V. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DAS MICROEMULSÕES SELECIONADAS

5.1.1 Efeito da adição de oleato de sódio e da incorporação da Doxorrubicina no comportamento reológico dos sistemas microemulsionados

A Figura 14 (A) mostra a relação entre a tensão de cisalhamento e a velocidade de cisalhamento para microemulsões (ME) preparadas com oleato de sódio. As curvas da Figura 14 (A) mostram que as ME comportam-se como sistemas não-newtonianos, pois não apresentam linearidade entre a tensão e a velocidade de cisalhamento (WOOD, 1986; SCOTT, 2000) e sugerem que estes sistemas apresentam as características de fluidos pseudoplásticos, não apresentando ponto de escoamento. Este comportamento resulta do alinhamento das gotículas coloidais formadas pelos componentes do sistema na direção do escoamento com o aumento a tensão ou velocidade de cisalhamento, reduzindo a resistência interna do sistema, com isso, a viscosidade diminui, podendo-se dizer que as ME “afinam-se” sob ação do cisalhamento (TOKUMOTO, 1996). A Figura 14 (B) mostra esta diminuição da viscosidade com o aumento da velocidade de cisalhamento. Pode-se observar, também, que a viscosidade varia muito pouco nas ME preparadas com até 6% de CHO, acima disto há um aumento abrupto da viscosidade com a proporção de colesterol.

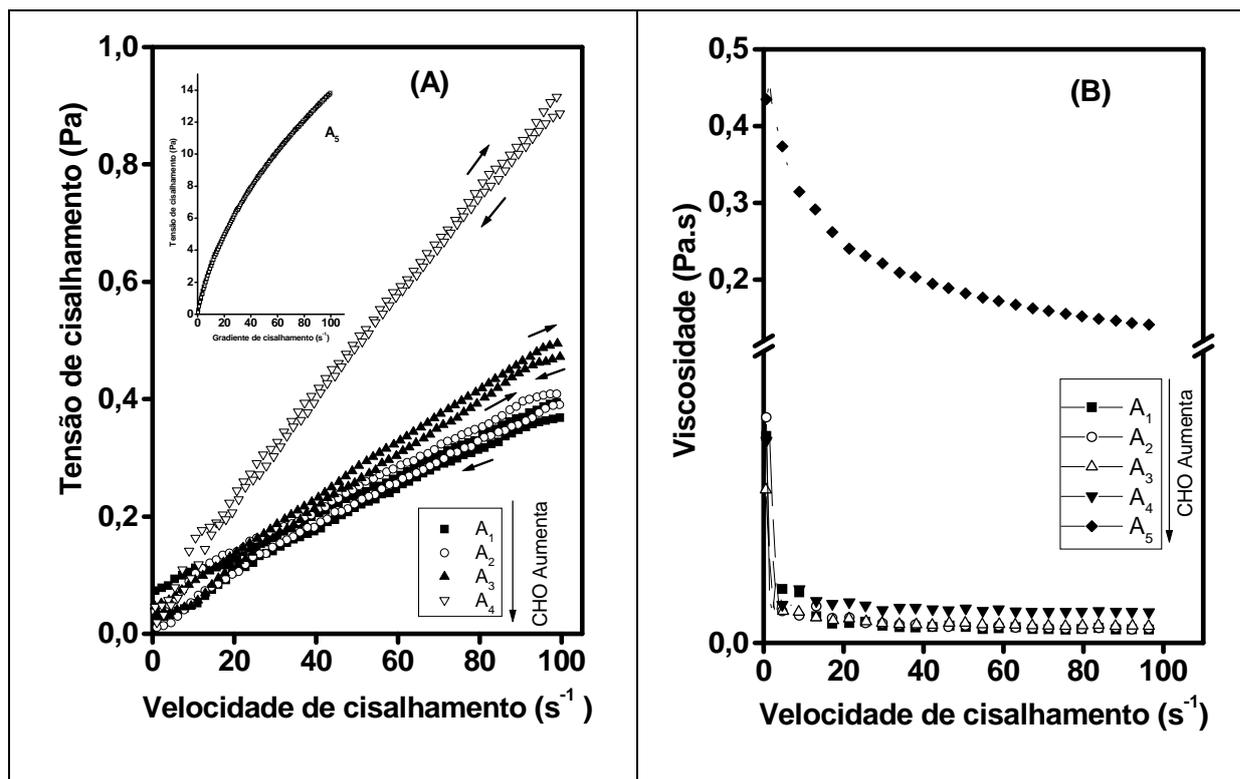


FIGURA 14. Tensão de cisalhamento x velocidade de cisalhamento das ME estabilizada com 18,5; 17; 15; 14 e 12,5% de EU/FS/OS (35:35:30 p/p), contendo 1,5; 3; 5; 6 e 7,5% de CHO, como fase oleosa e 80% de fase aquosa (A); viscosidade aparente x velocidade de cisalhamento (B).

O efeito da incorporação da doxorrubicina (DOX) na viscosidade das ME também foi investigada. A Figura 15 (A) mostra a relação entre a tensão de cisalhamento e a velocidade de cisalhamento para as ME preparadas com oleato de sódio variando a proporção EU/FS/OS e CHO contendo DOX. Assim, como as ME estudadas anteriormente (preparadas sem o fármaco), as ME com DOX também apresentaram comportamento de fluido pseudoplástico, e conseqüente diminuição da viscosidade com o aumento da velocidade de cisalhamento. A Figura 15 (B) mostra a variação da viscosidade aparente com a velocidade de cisalhamento e observa-se a diminuição da viscosidade sob ação de cisalhamento, confirmando o comportamento pseudoplástico do sistema. Pode-se notar também que a incorporação da DOX ao sistema (Figura 15 (B)), leva a um aumento da viscosidade aparente quando comparado com as ME sem o fármaco (Figura 14 (B)) e quando aumenta a proporção de colesterol do sistema. Estes efeitos podem ser explicados pela formação de microestruturas mais volumosas provocada pelas interações da DOX com a fase oleosa e que reflete diretamente sobre a viscosidade do sistema (FORMARIZ *et al.*, 2006). O aumento abrupto da

viscosidade acima da proporção de 6% de CHO verificada nas ME sem o fármaco (Figura 14 (B)), também é verificado quando a DOX é incorporada no sistema (Figura 15 (B)).

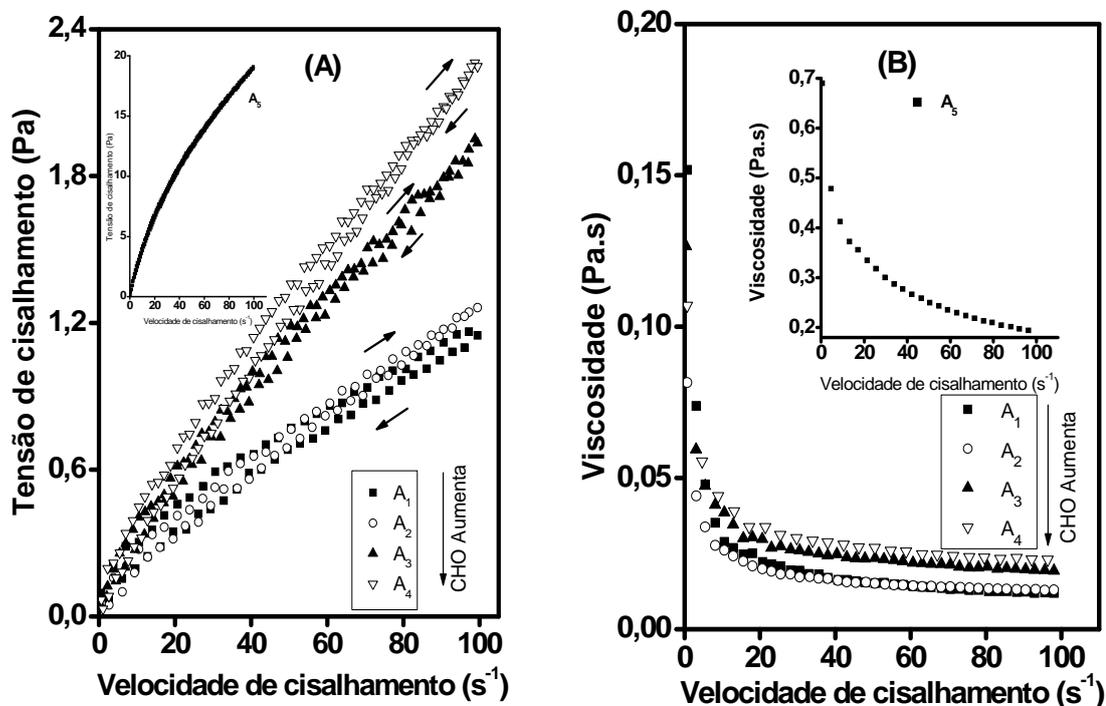


FIGURA 15. Tensão de cisalhamento x velocidade de cisalhamento das ME estabilizada com 18,5; 17; 15; 14 e 12,5% de EU/FS/OS (35:35:30 p/p), contendo 1,5; 3; 5; 6 e 7,5% de CHO, como fase oleosa e 80% de fase aquosa com 2mg/mL de DOX (A) ; viscosidade aparente x velocidade de cisalhamento (B).

Para descrever as características do fluxo das ME, uma vez que estes sistemas apresentam um comportamento pseudoplástico, um modelo de lei de potência foi utilizado. Assim, o comportamento do fluxo pode ser descrito pela equação (PRENTICE , 1984):

$$\tau = \mathbf{K} \cdot (\dot{\gamma})^n$$

em que τ é a tensão de cisalhamento, $\dot{\gamma}$ é a velocidade de cisalhamento, \mathbf{K} é o índice de consistência que está relacionado com a viscosidade 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 4 apresenta o comportamento de fluxo (**n**) e o índice de consistência (**K**) e o coeficiente de regressão (**R**²) para as diversas formulações de ME preparadas com e sem DOX. Os dados (Tabela 4) mostram que os valores de **n** tanto para as ME contendo ou não DOX são todos menores do que 1 indicando que estes sistemas apresentam comportamento pseudoplástico, confirmando os resultados anteriores. O grau de “pseudoplasticidade” pode ser medido pelo comportamento de fluxo (**n**) que aumenta com a diminuição da pseudoplasticidade. Assim, de maneira geral, à medida que aumenta a quantidade de colesterol (de 1,5 a 6%) no sistema, o grau de pseudoplasticidade torna-se menor e com 7,5% de colesterol volta a aumentar consideravelmente. A incorporação do fármaco contribui para aumentar esta pseudoplasticidade, conforme indicado na Tabela 4, os valores de **n** são menores quando comparados com as ME preparadas sem DOX.

Outrossim, a viscosidade dinâmica das ME pode ser avaliada com o índice de consistência (**K**) que aumenta com a viscosidade. Para ambos os sistemas, contendo ou não DOX, os valores de **K** (Tabela 4) variam muito pouco quando a proporção de colesterol aumenta de 1,5 a 6%, acima disto (7,5%) há um aumento abrupto, indicando que a viscosidade aumenta consideravelmente para as ME preparadas com quantidades elevadas de colesterol. A incorporação de DOX contribui ainda mais para o aumento da viscosidade do sistema, como pode ser visto na Tabela 4, em que observa-se que os valores de **K** são maiores quando comparados com as ME sem DOX. Todos esses resultados de reologia sugerem que a quantidade de colesterol e suas interações com o fármaco favorecem a cristalização do colesterol contribuindo para o aumento da viscosidade (HYDE, 2001; FARKAS *et al.*, 2001; STIDDER *et al.*, 2005), e o conseqüente aumento dos valores de **K**. Além disto, há um favorecimento na formação de uma rede estrutural que faz com que aumente o grau de pseudoplasticidade quando comparados com as ME sem o fármaco e presente para sistemas com maiores proporções de colesterol, como a preparada com 7,5 %, o maior comportamento pseudoplástico.

TABELA 4. Comportamento de fluxo (n) e índice de consistência (K) para as formulações preparadas com concentração fixa de fase aquosa e aumento da concentração de CHO, como fase oleosa contendo 2mg/mL de DOX.

<i>Formulações</i> <i>Sem DOX</i>	[CHO] %	N	K	R^2	<i>Formulações</i> <i>Com DOX</i>	[CHO] %	n	K	R^2
A_1	1,5	0,67	0,02	0,947	A_1	1,5	0,58	0,08	0,992
A_2	3	0,69	0,02	0,974	A_2	3	0,72	0,06	0,997
A_3	5	0,82	0,02	0,980	A_3	5	0,73	0,07	0,998
A_4	6	0,85	0,02	0,988	A_4	6	0,75	0,07	0,998
A_5	7,5	0,64	0,75	0,997	A_5	7,5	0,64	0,99	0,998

A literatura mostra que muitas ME também apresentam tixotropia (CERA, 2001; FORMARIZ, 2004). Os materiais pseudoplásticos podem apresentar a propriedade de afinar-se com a aplicação de velocidades de cisalhamento crescentes. Quando a velocidade de cisalhamento é removida, as tensões de cisalhamento são relaxadas e o sistema tenderá a readquirir a estrutura inicial, de tal forma que as curvas ascendentes e descendentes do reograma estarão deslocadas, resultando em uma área de histerese. Esse fenômeno é conhecido como tixotropia (MARTIN *et al.*, 1969; SHAW, 1975; SCOTT, 2000).

Dessa maneira, resolveu-se estudar também as propriedades tixotrópicas das microemulsões que estão diretamente relacionadas com os seus componentes. Nota-se que as ME contendo oleato de sódio (Figura 14 (A)) apresentam grau de tixotropia insignificantes com o aumento da concentração de CHO. Porém, quando a DOX é adicionada ao sistema, o grau de tixotropia aumenta (Figura 15 (A)). Além disso, o grau de tixotropia, estimado a partir da área de histerese entre as curvas ascendentes e descendentes do reograma, aumenta com a diminuição da concentração de colesterol (Figuras 14 (A) e 15 (A)) para as amostras contendo oleato de sódio.

O caráter tixotrópico das formulações (Figuras 14 (A) e 15 (A)) pode ser atribuído a uma rede fracamente estruturada formada pela agregação das gotículas coloidais que dão origem as regiões mais estruturadas. Como prevê a literatura, quando a concentração de CHO aumenta no sistema, a sua cristalização é favorecida e ocorre na forma de bicamadas lamelares, levando a uma estrutura com menor mobilidade (STIDDER *et al.*, 2005). Porém, essa estruturação pode ser destruída com o aumento da velocidade de cisalhamento e

facilmente recomposta quando essa velocidade diminui devido a uma possível quebra dos cristais de colesterol e à existência de forças de interações fracas entre gotículas ou agregados, ou entre as regiões mais estruturadas e o fármaco (DOX).

Maiores informações sobre a estrutura destes sistemas podem ser obtidas por análises reológicas a partir da aplicação de solicitação oscilatória. Neste tipo de ensaio, a tensão de cisalhamento varia como uma onda senoidal e a relação entre as ondas de tensão aplicada e a deformação resultante fornece informações sobre os tipos de resposta (elástica ou viscosa) do sistema. A partir da razão destas duas grandezas, obtém-se o módulo elástico complexo G^* . Tokumoto (1996) relata que a componente real do módulo elástico, G' , é denominada de módulo de armazenagem, porque representa a energia armazenada durante a deformação a tensão crescente e liberada quando a tensão é relaxada. A parte imaginária do módulo G'' , deve-se ao elemento viscoso que não pode armazenar energia, porque a tensão aplicada é dissipada na forma de deformação irreversível. Desse modo, G'' é denominado módulo de perda e leva em conta esta dissipação de energia. Sendo assim, estudou-se a evolução temporal dos módulos de armazenagem (G') e perda (G'') em função da frequência aplicada para as ME com OS contendo ou não DOX.

A evolução dos módulos de armazenagem G' e de perda G'' das ME com OS sem DOX são mostrados na Figura 16, em que pode-se observar que para as ME com quantidades inferiores a 7,5% de colesterol, a ausência de G' e a predominância de G'' indicam que essas amostras (A_1 , A_2 , A_3 e A_4) comportam-se praticamente como um sistema líquido viscoso. Esse comportamento é característico de soluções líquidas uma vez que G' e G'' apresentam uma dependência linear com a frequência. Por outro lado, para as ME com 7,5 % de CHO, G' está presente, mas com valores bem inferiores a G'' , sugerindo que essa amostra comporta-se como um líquido essencialmente viscoso constituído de uma rede fracamente estruturada, ou seja, apresenta propriedades viscoelásticas. Em ambos os casos, esses comportamentos dos fluidos associados à redução da viscosidade com a velocidade de cisalhamento (Figuras 14 (B) e 15 (B)) facilitam não somente a aplicação parenteral, mas também a preparação das ME estudadas (Tabelas 2 e 3).

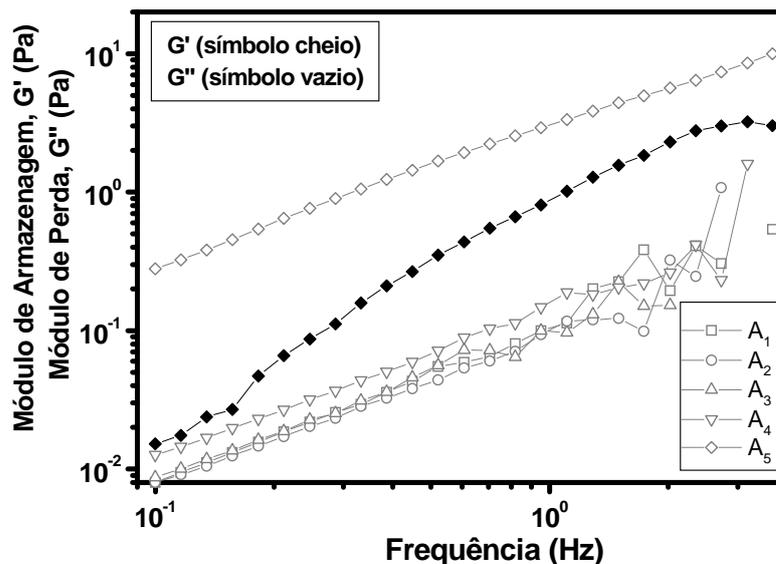


FIGURA 16. Evolução dos módulos de armazenamento G' e de perda G'' da ME estabilizada com 18,5; 17; 15; 14 e 12,5% de EU/FS/OS (35:35:30 p/p), contendo 1,5; 3; 5; 6 e 7,5% de CHO, como fase oleosa e 80% de fase aquosa, respectivamente.

Quando o fármaco é incorporado, todas as ME apresentam propriedades viscoelásticas, com valores de G' inferiores a G'' . A figura 17 mostra a evolução dos módulos de armazenamento (G') e de perda (G'') das ME com OS contendo DOX. Para as ME preparadas com 7,5% CHO, o número de interações elásticas aumenta, o que faz os valores de G' serem maiores em relação às proporções inferiores de CHO, porém a sua quantidade não é suficiente para caracterizar o sistema como sólido com característica predominantemente elástica, pois $G'' > G'$. Assim, pode-se sugerir que quando a DOX é adicionada ao sistema, esta favorece ainda mais a formação de agregados ou de pequenos cristais de colesterol (LOOMIS *et al.*, 1979; EPAND *et al.*, 2000 e 2001).

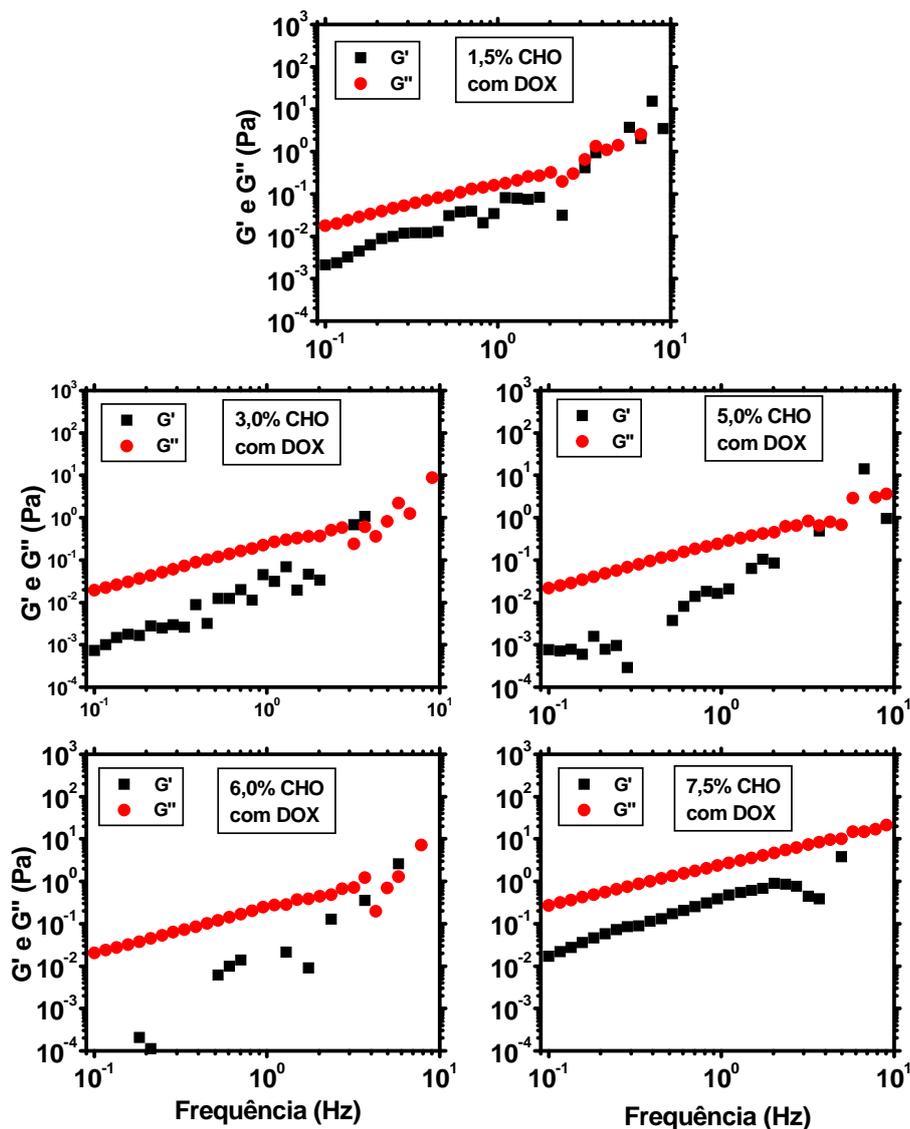


FIGURA 17. Evolução dos módulos de estocagem G' e de perda G'' da ME estabilizada com 18,5; 17; 15; 14 e 12,5% de EU/FS/OS (35:35:30 p/p), contendo 1,5; 3; 5; 6 e 7,5% de CHO, como fase oleosa e 80% de fase aquosa e 2mg/mL de DOX, respectivamente.

Ensaio de compliância (ou fluência-relaxação) foram realizados para comprovar a natureza viscoelástica das ME. A compliância é definida pela razão da deformação pela tensão. Neste teste, uma tensão constante é aplicada e a deformação da amostra é determinada em função do tempo (fluência). Na etapa de relaxação é retirada a tensão pré-determinada da amostra e essa retorna à forma original em função do tempo (MARRIOTT, 1988) podendo sugerir a propriedade do material estudado. A curva é dada em termos de compliância em

função do tempo, quanto menor a compliância maior é a componente elástica do sistema (KORHONEN, 2004).

A evolução das curvas de fluência-relaxação das ME com OS, sem e com DOX são mostradas na Figura 18 (A) e (B), respectivamente. Para as ME sem fármaco, com o aumento da concentração de colesterol, observa-se um pequeno desvio da linearidade nas curvas de deformação seguida de uma relaxação pouco acentuada (Figura 18 (A)), comportamentos típicos de sistemas viscosos, a qual a componente elástica é desprezível. Entretanto, para as ME sem DOX com alta concentração de colesterol (7,5%) (Figura 18 (A)) e com DOX incorporada (Figura 18 (B)), observa-se uma relaxação mais acentuada quando a tensão é removida além de um maior desvio da linearidade nas curvas de deformação seguida de uma relaxação pouco acentuada, o que caracteriza o comportamento típico de sistemas viscoelásticos.

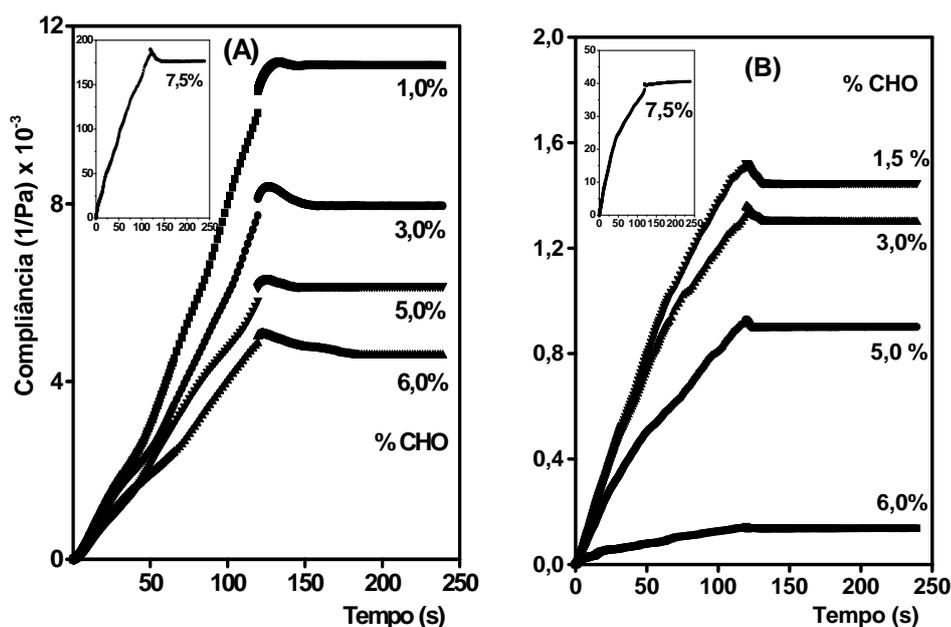


FIGURA 18. Evolução temporal da compliância das ME sem (A) e com DOX (B) estabilizada com 18,5; 17; 15; 14 e 12,5% de EU/FS/OS (35:35:30 p/p), contendo 1,5; 3; 5; 6 e 7,5% de CHO, como fase oleosa e 80% de fase aquosa, respectivamente.

A Figura 19 apresenta os valores de compliância extraídos no tempo de 119s da etapa de fluência para as ME com e sem DOX. A figura mostra que a compliância diminui com o aumento da quantidade de CHO, indicando a tendência de se obter sistemas mais viscoelásticos para elevados teores de CHO. Este comportamento evidencia o início da formação de interações entre as gotículas uma vez que a incorporação de colesterol no sistema

contribui para formar estruturas mais ordenadas e com isso contribuem para o aparecimento de regiões com partículas interconectadas por interações elásticas que permitem a recuperação da deformação após o alívio da tensão. Esse fato é evidenciado principalmente pela ME com 7,5% de CHO (LOOMIS *et al.*, 1979; EPAND *et al.*, 2000; 2001).

Com incorporação de DOX às ME, os valores de compliância (Figura 19) são menores quando comparados com as ME sem DOX, indicando que o fármaco favorece o aumento da viscoelásticidade do sistema, dessa maneira, a estruturação é ainda mais favorecida quando a DOX é incorporada ao sistema formando estruturas com menor mobilidade.

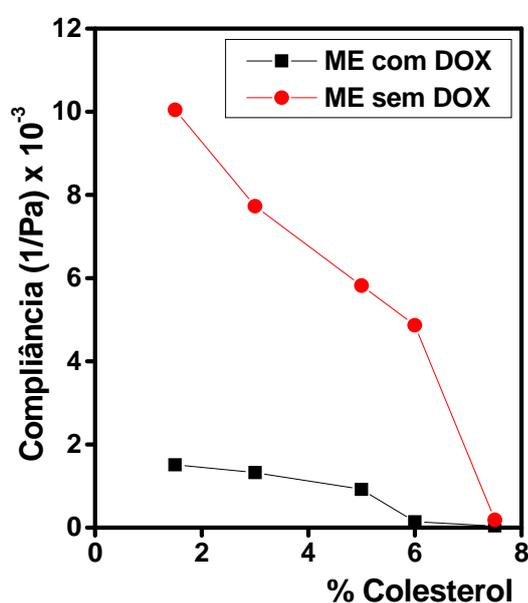


FIGURA 19. Valores de compliância a 119s (etapa de fluência) das ME em função da quantidade de colesterol.

5.1.1.2 Efeito da retirada do oleato de sódio (OS) e da incorporação da Doxorrubicina nos sistemas microemulsionados

Para estudar a influência do tensoativo e da incorporação de fármaco nas propriedades reológicas das ME, foram preparados sistemas sem o oleato de sódio (OS), incorporando ou não a doxorrubicina (DOX). O comportamento reológico foi analisado por ensaios de escoamento, oscilação e fluência-relaxação, utilizando a mesma sistemática dos estudos anteriores. A Figura 20 mostra a relação entre a tensão de cisalhamento e a velocidade de cisalhamento para as ME preparadas sem oleato de sódio sem (A) e com (B) DOX. As curvas (Figura 20) mostram que as ME sem OS comportam-se como fluidos plásticos com uma tensão limite de escoamento, principalmente para as formulações acima

de 3% de colesterol (CHO). A presença de interações entre as gotículas coloidais ou aglomerados ocasiona um aumento da viscosidade do sistema e dificulta o escoamento. A tensão limite representa a tensão máxima que o sistema suporta sem quebra das interações existentes e, portanto, quando excedida, o sistema escoar normalmente. A Figura 20 também mostra que, com exceção das ME com 3 % de CHO, todas apresentam propriedades tixotrópicas. Nota-se que o grau de tixotropia, estimado a partir da área de histerese entre as curvas ascendentes e descendentes do reograma, aumenta com o aumento da concentração de colesterol e quando o OS é retirado da formulação.

O caráter tixotrópico e a presença de uma tensão limite de escoamento pode, portanto, ser atribuído a uma rede fracamente estruturada formada pela agregação das gotículas coloidais que dão origem às regiões mais estruturadas. Isto ocorre devido ao aumento da concentração de CHO no sistema e retirada do OS, fato que favorece a sua cristalização, ocorrendo na forma de bicamadas lamelares, levando a uma estrutura com menor mobilidade (STIDDER *et al.*, 2005). A incorporação de fármaco às ME contribui ainda mais para estruturação do sistema, entretanto ela pode ser facilmente destruída com o aumento da tensão ou da velocidade de cisalhamento, e facilmente recomposta quando essa velocidade diminui.

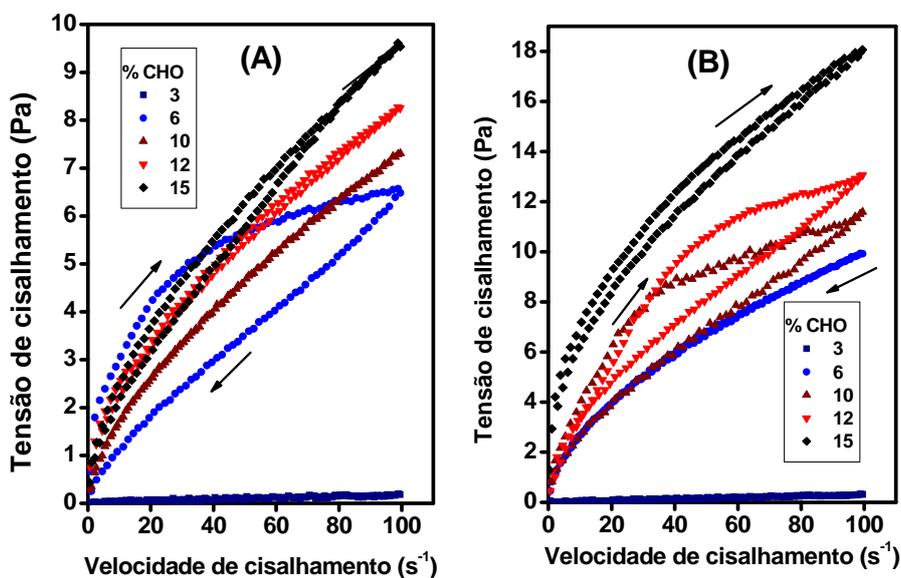


FIGURA 20. Tensão de cisalhamento x velocidade de cisalhamento das ME estabilizada com 17, 14, 10, 8 e 5% de EU/FS (1:1) contendo 3, 6, 10, 12 e 15% de CHO, como fase oleosa e 80% de fase aquosa (A) e 2mg/mL de DOX (B), respectivamente.

Por serem sistemas que se comportam como fluidos plásticos, as altas taxas de cisalhamento aplicadas provocam além da desestruturação, a diminuição da viscosidade. No caso das ME, isto deve-se ao alinhamento das gotículas coloidais na direção do escoamento, diminuindo a resistência interna e conseqüentemente a viscosidade. Este fenômeno pode ser melhor ilustrado a partir da Figura 21. As Figuras 21 (A) e (B) mostram as curvas log-log de viscosidade versus velocidade de cisalhamento para diversas ME preparadas com diferentes quantidades de CHO sem e com DOX, respectivamente. Pode-se observar que realmente o sistema “afina-se”, ou seja, sua viscosidade diminui. Além disto, há um aumento da viscosidade conforme aumenta as proporções de CHO e quando o OS é retirado do sistema para ambas as formulações. Quando comparadas, as ME com fármaco incorporado apresentaram valores de viscosidade superiores, confirmando que a adição de DOX na preparação contribui ainda mais para a estruturação do sistema, pois o fármaco interage com as gotas de óleo induzindo a cristalização do colesterol. Isso também pode ser explicado pela interação da DOX na interface dos sistemas, a qual possui uma estrutura volumosa, podendo perturbar a organização da interface, promovendo espaçamento entre as moléculas de tensoativo, formando uma estrutura mais organizada (SON *et al.*, 2003) e levando ao aumento da viscosidade.

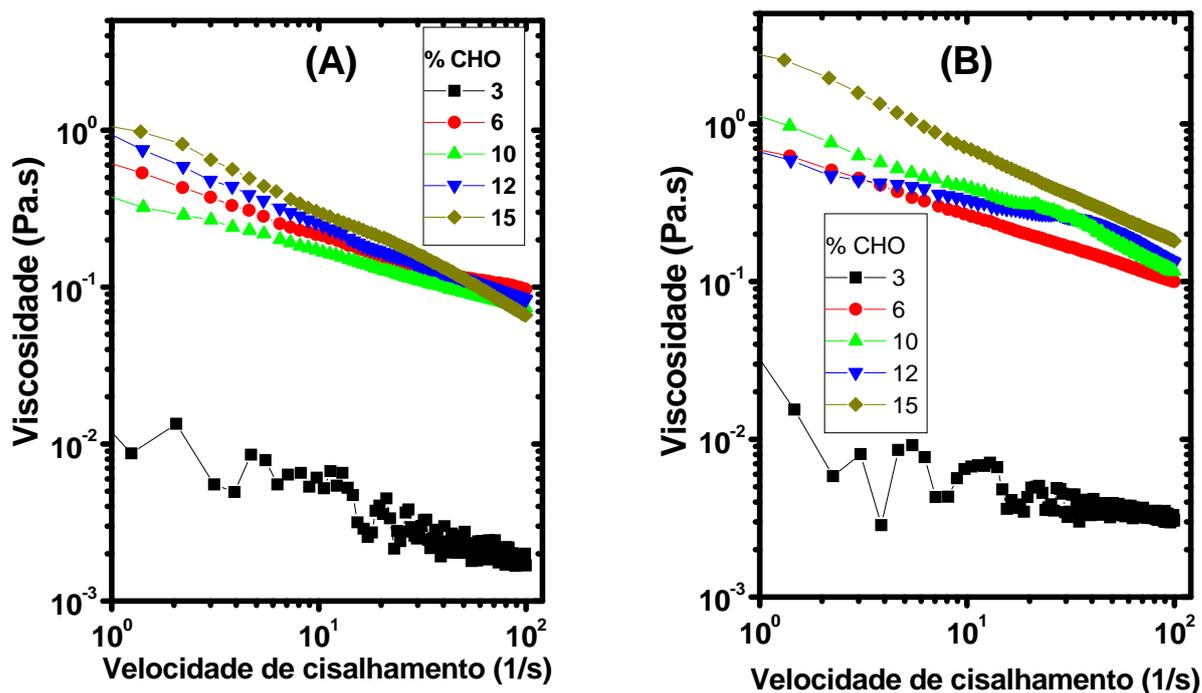


FIGURA 21. Curva log-log de viscosidade versus velocidade de cisalhamento para diversas ME preparadas com diferentes quantidades de CHO sem (A) e com (B) 2mg/mL de DOX.

A viscosidade de fluidos não-newtonianos (fluidos pseudoplásticos, plásticos entre outros), é denominada viscosidade aparente, pois neste caso, além da temperatura e pressão (características de fluidos newtonianos), ela é dependente também da velocidade de cisalhamento e do tempo (ATKINSON, 2005). As microemulsões e mesofases líquido-cristalinas podem ser grosseiramente caracterizadas verificando-se a viscosidade aparente. A fase lamelar geralmente apresenta-se como um fluido viscoelástico, a fase hexagonal tem a viscosidade semelhante à de um gel, enquanto que a viscosidade da fase cúbica é extremamente elevada (GABBOUN *et al.*, 2001; HYDE, 2001).

Correa e colaboradores (2005) mostraram que a viscosidade aparente de sistemas microemulsionados é dependente do volume de fase e da natureza da fase oleosa, visto que o aumento do volume de fase interna oleosa provocou um aumento da viscosidade aparente e que microemulsões com estruturas bicontínuas apresentam valores de viscosidade mais altos. A caracterização físico-química de sistemas microemulsionados, principalmente por estudos de viscosidade aparente, pode auxiliar na interpretação dos experimentos de liberação “*in vitro*” e “*in vivo*”. Uma vez que a viscosidade do sistema está relacionada diretamente com a

velocidade de liberação “*in vitro*” e com o processo de difusão “*in vivo*”, facilitando ou dificultando a fração de fármaco disponível por unidade de tempo (CORREA *et al.*, 2005).

Por apresentarem uma tensão limite de escoamento, um modelo que pode descrever estes sistemas é o de Herschel-Bulkley que segue a equação (HANKS, 1974):

$$\tau = \tau_y + \mathbf{K} \cdot (\dot{\gamma})^n$$

em que τ_y é a tensão limite de escoamento. As Figuras 22 (A) e (B) mostram a variação de τ_y , $\dot{\gamma}$ e \mathbf{K} em função da % de CHO utilizado na preparação das ME sem e com incorporação do fármaco, respectivamente.

De uma maneira geral, pode-se observar (Figura 22) que a tensão limite de escoamento e o índice de consistência relacionada à viscosidade aumentam conforme aumenta a concentração de CHO no sistema, estes parâmetros são mais acentuados quando a DOX é adicionada ao sistema. Estes resultados confirmam que o aumento da fase oleosa, no caso o CHO, provoca um aumento da viscosidade das ME, pois promove um maior empacotamento das moléculas de fosfatidilcolina de soja (co-tensoativo) e induzem a formação de uma estrutura mais organizada, mais rígida e com menor mobilidade (TIROSH *et al.*, 1997).

Os valores de n menores que 1, confirmam que todas as ME seguem o comportamento de um fluido plástico. Além disto, o grau de “plasticidade” pode ser medido por n que diminui conforme aumenta a plasticidade, indicando que apesar da existência de interações que causam a estruturação dos sistema, estas podem ser facilmente quebradas, o que leva às gotículas coloidais individualizadas ou aglomerados a se orientarem na direção do escoamento.

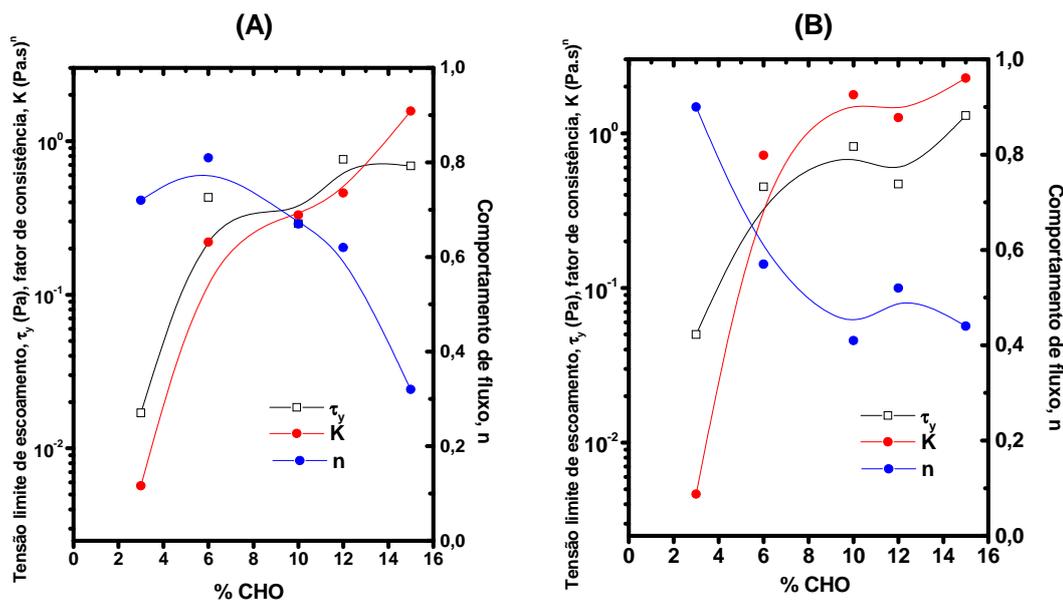


FIGURA 22. Variação da tensão limite de escoamento (τ_y), do índice de consistência (K) e do comportamento de fluxo (n) em função da % de CHO utilizado na preparação das ME sem e com incorporação do fármaco, respectivamente.

Melhores informações sobre a estrutura com perturbação mínima do sistema podem ser obtidas utilizando a análise reológica a partir da aplicação de solitação oscilatória. A evolução dos módulos de armazenagem G' e de perda G'' das ME sem DOX são mostrados na Figura 23.

A Figura 23 mostra que, exceto para as ME preparadas com 3% CHO, todas apresentaram G' , indicando que estas formulações (de 6% a 15% de CHO) possuem uma componente elástica que é atribuída a presença de uma rede estrutural interconectada. Estes resultados confirmam os ensaios de escoamento, aonde as ME com quantidade acima de 3% de CHO apresentaram propriedades tixotrópicas. Entretanto, $G' < G''$ a frequências (f) inferiores a aproximadamente 3 Hz, acima disto $G' > G''$. Isto indica que estas formulações para $f < 3$ Hz se comportam como um líquido viscoso.

Para $f > 3$ Hz, as ME apresentam um caráter elástico mais pronunciado, indicando que o sistema se comporta como um sólido elástico. Provavelmente, frequências maiores favorecem as interações entre as gotículas coloidais e consolidam a formação de uma rede estrutural interconectada. Esse comportamento do fluido restringe a aplicação parenteral dessas ME, além de dificultar a sua preparação.

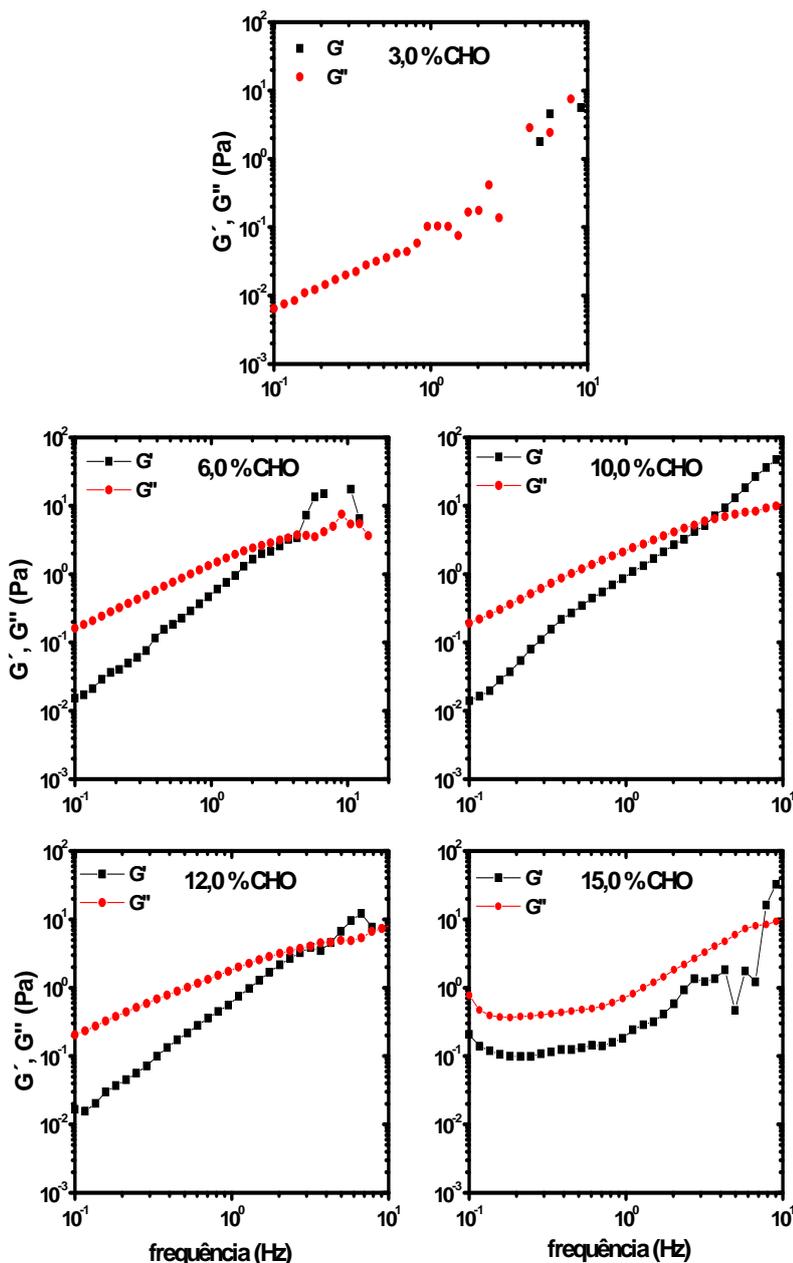


FIGURA 23. Evolução dos módulos de estocagem G' e de perda G'' da ME, em função das quantidades de 3, 6, 10, 12 e 15% de CHO.

A adição de DOX promove ainda mais a estruturação do sistema, como discutido anteriormente. A Figura 24 mostra a evolução de G' e G'' em função da quantidade de CHO com DOX e confirma estes resultados. Semelhante as ME sem o fármaco, formulações com 3% de CHO não apresentam valores de G' , indicando que não possuem uma componente elástica definida. Este resultado revela o caráter mais fluido desta formulação entre todas as ME estudadas. Com o aumento de CHO, G' está presente e para as ME com 6 e 12 % de

CHO, G' é menor que G'' para baixas frequências, já as ME com 10 e 15% de CHO apresentam, nesta região de frequência, valores de G' e G'' praticamente iguais. Estes resultados revelam que os sistemas em algumas proporções de CHO (de 6 e 12% de CHO) comportam-se como líquidos viscosos, enquanto que aqueles com proporções de 10 e 15% tendem a comportar-se como sólidos elásticos. Quando a frequência aumenta todas as ME apresentam $G' > G''$.

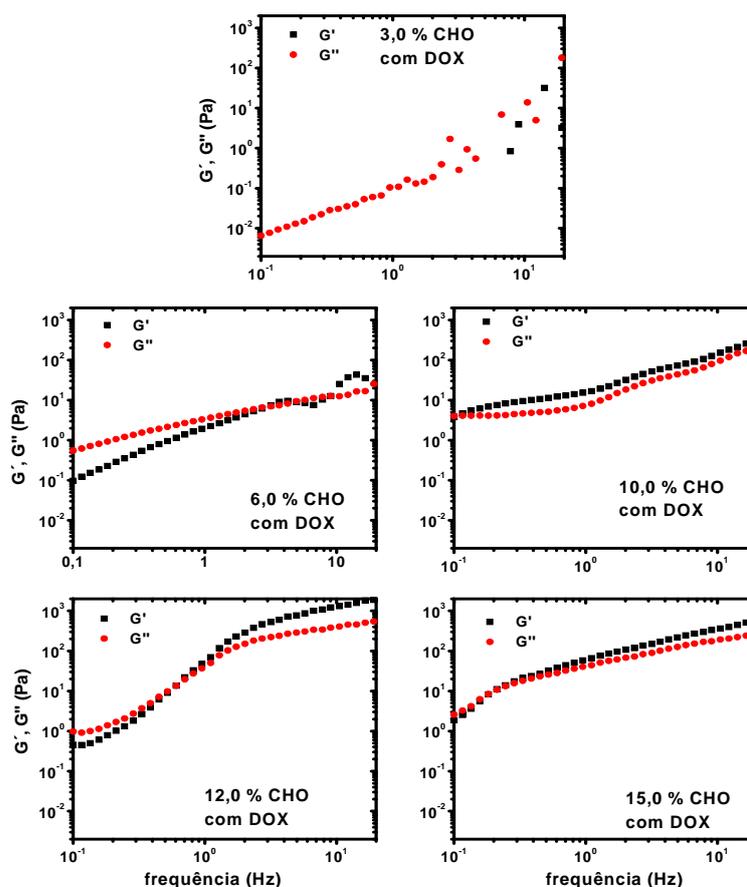


FIGURA 24. Evolução dos módulos de estocagem G' e de perda G'' da ME, em função das quantidades de 3, 6, 10, 12 e 15% de CHO para ME preparadas com DOX.

Pelos estudos anteriores a viscosidade e a elasticidade do sistema aumentavam com a quantidade de CHO, portanto, era esperado que os valores de G' para as ME com DOX aumentasse ainda mais em função da quantidade de CHO na preparação. Além disto, para as ME com 10 e 15% de CHO fica difícil quantificar à baixas frequências os valores de G' e G'' e determinar o comportamento reológico destas formulações. Com isso, a análise de $\tan \delta$ pode ser uma ferramenta simples e direta que possibilita quantificar a viscoelasticidade do sistema, ou seja, o quanto esse sistema microemulsionado é um sólido elástico ou um líquido

viscoso. O $\tan \delta$, também conhecido como ângulo de defasagem, é a razão entre G'' e G' . Quando $\tan \delta$ é maior que 1, indica que $G'' > G'$ e o material tem um comportamento semelhante a um líquido viscoso e quando $\tan \delta < 1$, $G'' < G'$ e o comportamento é de um sólido elástico (XU e KORLLING, 2005). A Figura 25 apresenta a variação de $\tan \delta$ em função da frequência para várias proporções de CHO. Nota-se que a ME com 6% de CHO é essencialmente um líquido viscoso, pois $\tan \delta \gg 1$; para as outras proporções um comportamento atípico ocorre, por exemplo, a ME com 10% possui uma componente elástica muito mais acentuada do que 15% (a princípio a mais viscoelástica), pois em quase todo o intervalo de frequência estudado apresenta $\tan \delta < 1$, o que indica o comportamento de um sólido elástico. Este fenômeno pode ser devido à formação de pequenos cristais de CHO distribuídos localmente em regiões específicas da amostra que podem mascarar a medida e a ME pode ser erroneamente considerada como mais ou menos viscoelástica.

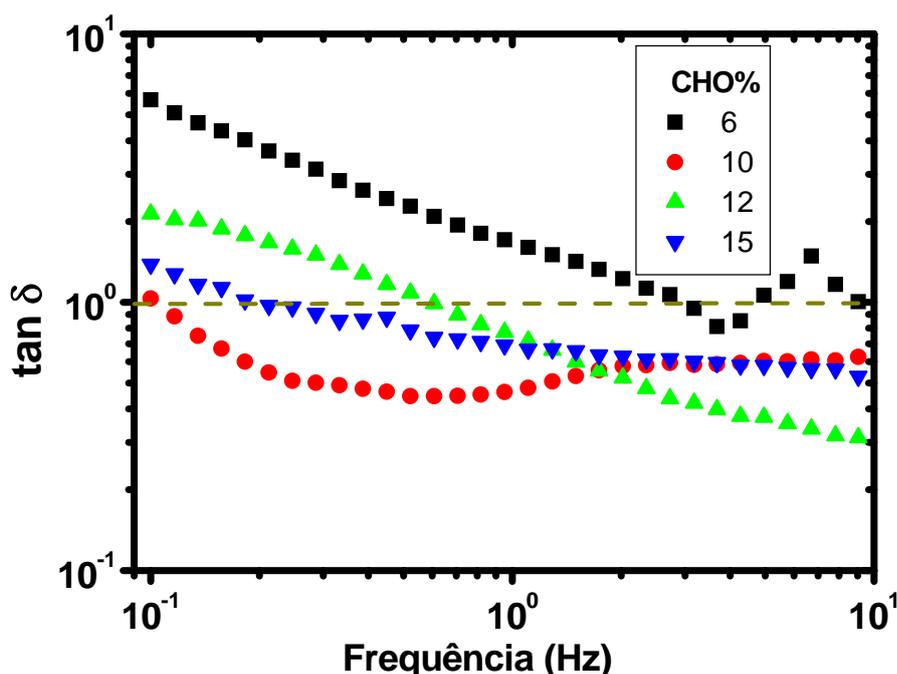


FIGURA 25. Variação da $\tan \delta$ em função da frequência para ME com DOX com várias proporções de CHO.

A evolução das curvas de fluência-relaxação das ME sem DOX são apresentados na Figura 26. A compliância, definida como a razão entre a deformação e a tensão aplicada, é estudada em função do tempo (KORHONEN, 2004). As curvas apresentadas na Figura 26, confirmam ainda mais o caráter viscoelástico das ME com DOX observados nos ensaios oscilatórios. Nota-se com exceção da formulação com 3% de CHO, que como visto

anteriormente, não apresentou uma componente elástica, as outras formulações apresentaram o comportamento de sistemas líquidos viscosos com uma componente elástica acentuada, indicando que existem regiões com partículas interconectadas por interações que permite a recuperação da deformação após o alívio da tensão e é ainda mais favorecida quando a DOX é incorporada ao sistema formando estruturas com menor mobilidade.

Em termos de compliância, quanto menor o seu valor, maior é a componente elástica do sistema (KORHONEN, 2004). As Figuras 26 e 27 mostram a diminuição da compliância com o aumento da proporção de CHO, confirmando o que era esperado para este sistema, ou seja, aumento das interações elásticas entre as gotículas coloidas ou agregados favorecidas pela adição de CHO e DOX. Este comportamento pode ocorrer devido a formação de CHO na forma lamelar ou a formações de pequenos cristais de CHO (LOOMIS *et al.*, 1979; EPAND *et al.*, 2000 e 2001), onde uma rede sólida tridimensional pode ser formada immobilizando a DOX na interface e o sistema adquire característica de um sólido elástico.

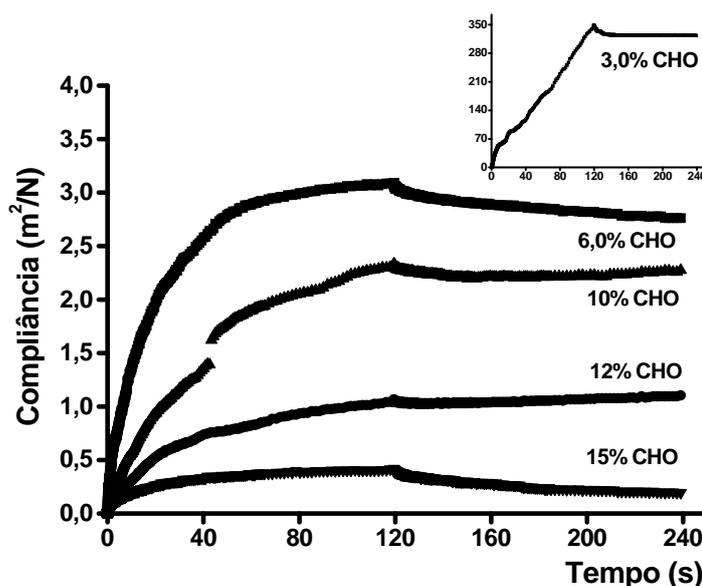


FIGURA 26. Evolução temporal dos diagramas de fluência-relaxação da ME estabilizada com 17, 14, 10, 8 e 5% de EU/FS (1:1), contendo 3, 6, 10, 12 e 15% de CHO, como fase oleosa e 80% de fase aquosa, respectivamente.

A partir dos estudos do comportamento reológico é possível sugerir a evolução estrutural das ME. Inicialmente as gotículas estão monodispersas, com adição do CHO, há uma aproximação destas gotículas tendendo a interligar-se fisicamente. O sistema adquire propriedades viscoelásticas principalmente quando a concentração de CHO aumenta (Figura

26) e a DOX é incorporada ao sistema (Figura 27), indicando que os agregados de gotículas coloidais crescem e começam a interagir, levando à formação de CHO na forma lamelar ou a formações de pequenos cristais de CHO causando a turbidez do sistema.

A componente elástica do sistema aparece à medida que aumenta a concentração de CHO (7,5% - Figura 26) e quando a DOX (Figura 27) é incorporada no sistema indicando que o número de interações elásticas aumentam, porém a sua quantidade não é o suficiente para caracterizar o sistema como sólido com características predominantemente elásticas. Assim, pode-se sugerir que quando a DOX é adicionada ao sistema, esta favorece ainda mais a formação de agregados ou de pequenos cristais de CHO (LOOMIS *et al.*, 1979; EPAND *et al.*, 2000; 2001).

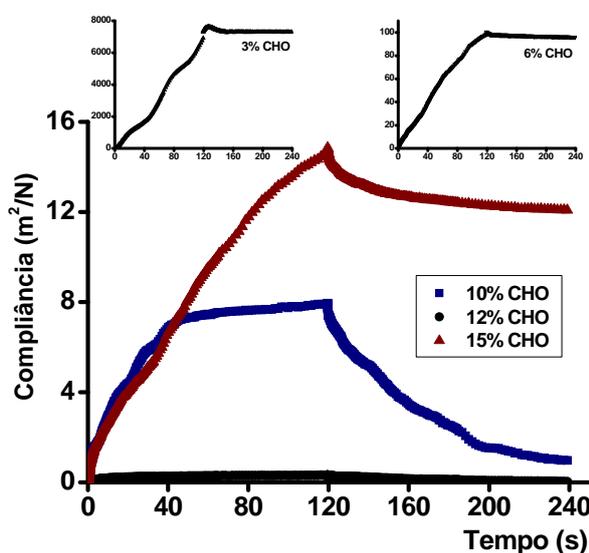


FIGURA 27. Evolução temporal dos diagramas de fluência-relaxação da ME estabilizada com 17, 14, 10, 8 e 5% de EU/FS (1:1), contendo 3, 6, 10, 12 e 15% de CHO, como fase oleosa, 80% de fase aquosa e 2mg/mL de DOX, respectivamente.

A mistura de tensoativos com água, em determinadas proporções, na ausência ou na presença de substâncias lipofílicas podem formar diferentes tipos de agregados, entre os quais agregados polimorfos representados pelas ME, que estão intimamente ligados com a proporção e a natureza dos componentes da mistura (FORMARIZ *et al.*, 2006). Dessa maneira, de acordo com os dados de reologia, viscosidade aparente, compliância e ensaios oscilatórios a propriedade desses sistemas influenciaram diretamente na incorporação da

DOX, podendo influenciar fortemente na liberação “*in vivo*” assim como na sua biodisponibilidade.

5.1.2 Microscopia de luz polarizada

As Figuras 28 a 31 mostram as fotomicrografias das amostras que diferem entre si pela proporção de tensoativos e de fase interna oleosa utilizada para obter as ME. A composição de cada ME está descrita na metodologia (Tabelas 2 e 3). Esses sistemas apresentam um aumento da quantidade de colesterol de 1,5; 3; 5; 6 e 7,5%, respectivamente.

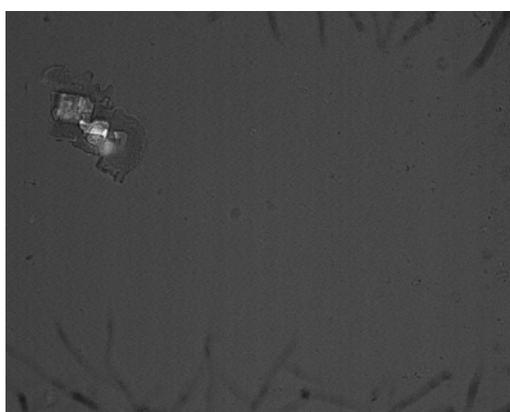


FIGURA 28. Fotomicrografia representativa da ME estabilizada com 18,5 e 17% de EU/FS/OS (35:35:30 p/p), contendo 1,5 e 3% de CHO como fase oleosa e 80% de fase aquosa. *Formulações:* A₁, A₂, respectivamente. Aumento 20x.



FIGURA 29. Fotomicrografia representativa da ME estabilizada com 18,5 e 17% de EU/FS/OS (35:35:30 p/p), contendo 1,5 e 3% de CHO como fase oleosa, 80% de fase aquosa e 2mg/mL de Dox. *Formulações:* A₁, A₂, respectivamente. Aumento 20x.

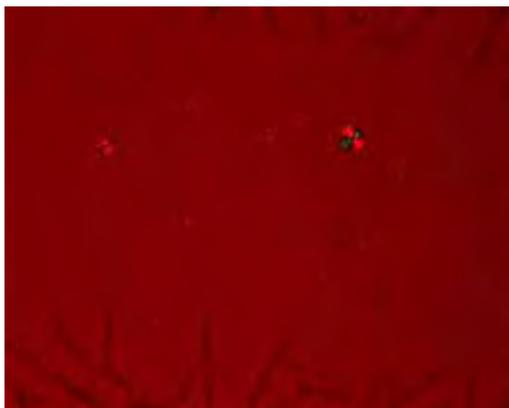


FIGURA 30. Fotomicrografia representativa da ME estabilizada com 15, 14 e 12,5% de EU/FS/OS (35:35:30 p/p), contendo 5, 6 e 7,5 % de CHO como fase oleosa e 80% de fase aquosa. *Formulações: A₃, A₄ e A₅, respectivamente. Aumento 20x.*



FIGURA 31. Fotomicrografia representativa da ME estabilizada com 15, 14 e 12,5% de EU/FS/OS (35:35:30 p/p), contendo 5, 6 e 7,5% de CHO como fase oleosa, 80% de fase aquosa e 2mg/mL de Dox. *Formulações: A₃, A₄ e A₅, respectivamente. Aumento 20x.*

Nota-se para as amostras (Figuras 28 e 29) que apresentam cerca de 1,5 e 3% de fase interna oleosa (colesterol) um comportamento isotrópico (campo escuro), ou seja, sob o plano de luz polarizada, não desviam luz sugerindo a formação de sistema microemulsionado uma vez que a viscosidade aparente da fase cúbica é extremamente elevada (GABBOUN *et al.*, 2001; HYDE, 2001) e os resultados de viscosidade aparente dessas amostras é baixa conforme mostra as Figuras 14 (B) e 15 (B) (Formulações: A₁, A₂). As fotomicrografias sugerem que nessas concentrações de colesterol (1,5 e 3%) a incorporação do fármaco não interfere na estruturação das fases (Figura 29).

Por outro lado, à medida que a concentração de colesterol aumenta (5, 6, e 7,5%) observa-se que há um desvio sob o plano de luz polarizada, resultando no aparecimento de “cruzes de malta”, características de estrutura de fase lamelar (Figura 30), indicando que a variação na porcentagem e composição do tensoativo e no volume de fase interna oleosa interferem no grau de estruturação dos sistemas, tornando-os mais ordenados. Entretanto, quando a DOX é incorporada ao sistema (Figura 31) a estruturação é ainda mais favorecida, levando a formação de estruturas com menor mobilidade. Esse fato também pode ser comprovado pelos gráficos de viscosidade (Figura 14 (B)) que mostram um aumento da viscosidade com o aumento da concentração de colesterol. Com a incorporação de DOX no sistema a viscosidade aumenta (Figura 15 (B)) ainda mais e esse fato deve estar associado à formação da fase lamelar do colesterol, que segundo a literatura apresenta-se como um fluido viscoelástico (GABBOUN *et al.*, 2001; HYDE, 2001).

A análise da fotomicrografia da microemulsão sem oleato de sódio contendo colesterol na concentração de 3% (Figura 32) e da mesma microemulsão contendo DOX (Figura 33) apresenta um comportamento isotrópico e sugere que nessa concentração de colesterol (3%) a incorporação do fármaco não interfere na estruturação das fases do sistema (Figura 33) sugerindo também a formação de sistema microemulsionado uma vez que os resultados de viscosidade dessas amostras é baixa conforme mostra Figura 21 (A) e (B) (Formulação: B₁).

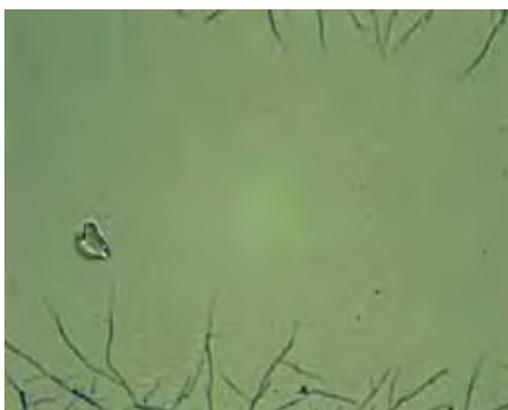


FIGURA 32. Fotomicrografia da ME estabilizada com 17% de EU/FS (1:1), contendo 3 % de CHO, como fase oleosa e 80% de fase aquosa. *Formulação: B₁.* Aumento 20x.



FIGURA 33. Fotomicrografia da ME estabilizada com 17% de EU/FS (1:1), contendo 3 % de CHO como fase oleosa, 80% de fase aquosa e 2mg/mL de Dox. *Formulação: B₁.* Aumento 20x.

As fotomicrografias apresentadas nas Figuras 34 a 37 revelam que tanto para as microemulsões sem oleato contendo colesterol nas seguintes concentrações 6, 10, 12 e 15% (Figuras 34 e 36) quanto para essas mesmas microemulsões contendo DOX (Figuras 35 e 37) os sistemas apresentam comportamento anisotrópico, ou seja, desviam a luz polarizada, resultando no aparecimento de “cruzes de malta”, característico de estrutura de fase lamelar (Figuras 34 e 35) e de cristais, característico de estrutura de uma fase cristalina (Figura 36 e 37).

Assim, à medida que aumenta a concentração de colesterol e/ou o fármaco é incorporado ao sistema tanto o CHO como a DOX favorecem ainda mais a formação de cristais. A fotomicrografia do colesterol utilizado no preparo das amostras (Figura 38) revela a possibilidade da ocorrência da cristalização do colesterol, entretanto a natureza da fase cristalina só pode ser determinada com precisão por medidas de difração de raios-X. Entretanto, sabe-se da literatura que quando a concentração de CHO aumenta no sistema, a sua cristalização é favorecida e ocorre na forma de bicamadas lamelares, levando a uma

estrutura com menor mobilidade e a um aumento no grau de empacotamento das gotículas (STIDDER *et al.*, 2005).

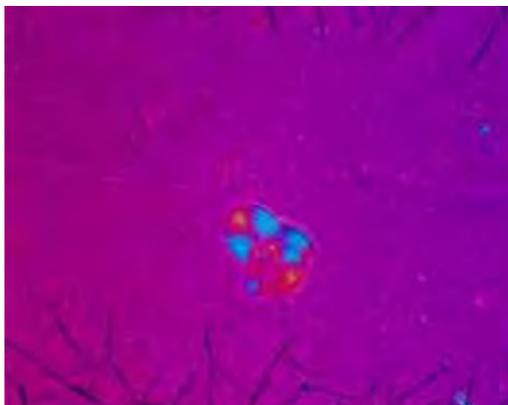


FIGURA 34. Fotomicrografia da ME estabilizada com 14% de EU/FS (1:1), contendo 6 % de CHO, como fase oleosa e 80% de fase aquosa. *Formulação: B₂.* Aumento 20x.

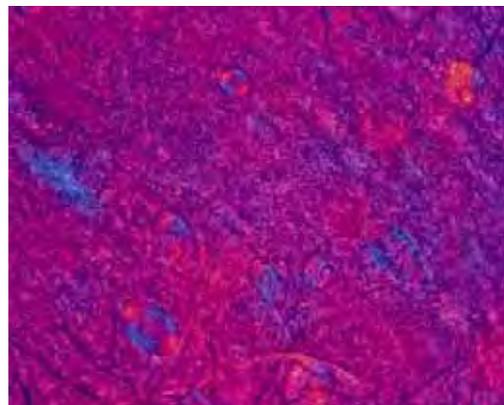


FIGURA 35. Fotomicrografia da ME estabilizada com 14% de EU/FS (1:1), contendo 6 % de CHO como fase oleosa, 80% de fase aquosa e 2mg/mL de Dox. *Formulação: B₂.* Aumento 20x.

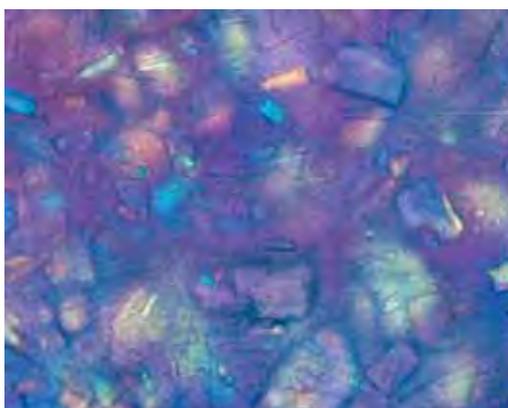


FIGURA 36. Fotomicrografia representativa da ME estabilizada com 10, 8 e 5% de EU/FS (1:1), contendo 10, 12 e 15 % de CHO, como fase oleosa e 80% de fase aquosa. *Formulações: B₃, B₄ e B₅, respectivamente.* Aumento 20x.

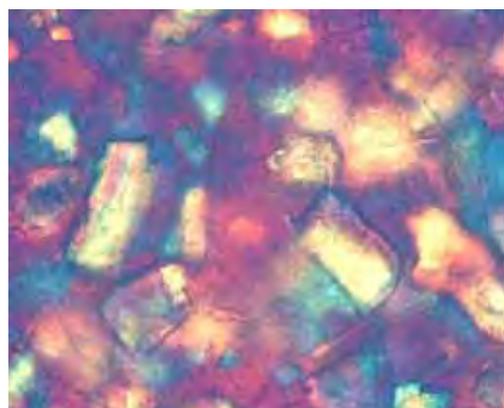


FIGURA 37. Fotomicrografia representativa da ME estabilizada com 10, 8 e 5% de EU/FS (1:1), contendo 10, 12 e 15 % de CHO como fase oleosa, 80% de fase aquosa e 2mg/mL de Dox. *Formulações: B₃, B₄ e B₅, respectivamente.* Aumento 20x.

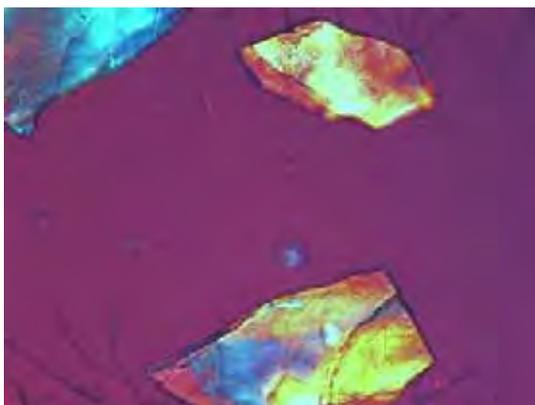


FIGURA 38. Fotomicrografia da solução aquosa de colesterol ([CHO]= 0,2 mg/mL). Controle positivo. Aumento 20x.

Nesse contexto, a formação de cristais de colesterol ou colesterol com fase lamelar, além de afetar a liberação do fármaco, pode alterar a direção do seu movimento, assim como aumentar sua solubilidade, em função das regiões de diferentes polaridades existentes nesses sistemas (FARKAS *et al.*, 2001).

5.1.3 Espalhamento de luz a baixo ângulo (SAXS)

As Figuras 39-40 e 42-43 mostram as curvas das intensidades de espalhamento $I(\mathbf{q})$ em função do vetor de espalhamento (\mathbf{q}) das formulações selecionadas e apresentadas na Tabelas 5 a 8. Nota-se pela curva de SAXS da amostra com menor concentração de colesterol a presença de um pico localizado a $q=0,073$. À medida que a concentração de colesterol aumenta e de oleato de sódio diminui há um deslocamento da posição máxima do pico de $q=0,073$ para $q=0,0892 \text{ \AA}^{-1}$. Esse deslocamento indica uma mudança na distância entre os objetos espalhadores, que é dada por $d=2\pi/q_{\max}$, onde q_{\max} é a posição do máximo do pico. Quando a concentração de colesterol passa de 5 para 15% ocorre uma diminuição na distância de 86 para 70Å. Um alargamento dos picos também é observado com o aumento de colesterol e esse comportamento sugere a desestruturação das gotículas das microemulsões ou de seus agregados para formar uma nova estrutura. A formação de agregados com um maior grau de organização ou de cristais é favorecida quando ocorre o aumento da concentração de colesterol associada à incorporação de DOX no sistema conforme pode-se observar na Figura 40 em que há formação de picos característico de sistemas mais ordenados a valores de q entre 0,0675 a 0,092 \AA^{-1} .

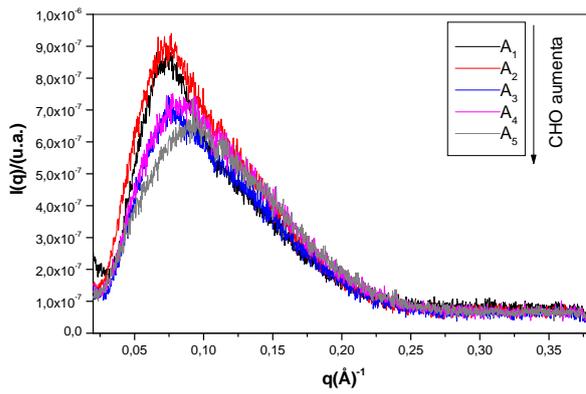


FIGURA 39. Evolução estrutural das ME estabilizada com 18,5; 17; 15; 14 e 12,5% de EU/FS/OS (35:35:30 p/p), contendo 1,5; 3; 5; 6 e 7,5% de CHO como fase oleosa e 80% de fase aquosa, respectivamente.

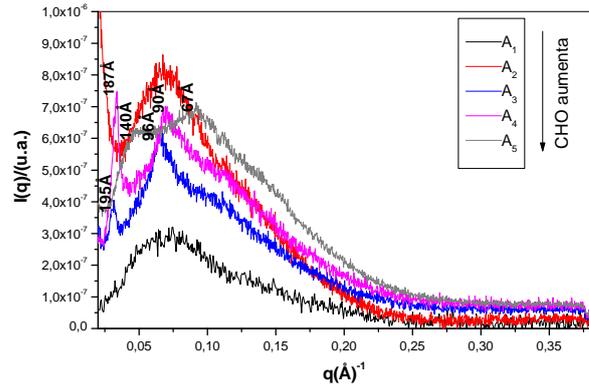


FIGURA 40. Evolução estrutural das ME estabilizada com 18,5; 17; 15; 14 e 12,5% de EU/FS/OS (35:35:30 p/p), contendo 1,5; 3; 5; 6 e 7,5% de CHO como fase oleosa e 80% de fase aquosa e 2mg/mL de Dox, respectivamente.

A literatura descreve vários modelos específicos para reproduzir as curvas experimentais de SAXS, os quais levam em conta o fator estrutural como, por exemplo, a presença de micelas esféricas altamente homogêneas (GLATTER, 1982). Nesses sistemas, a correlação entre as micelas é caracterizada pela presença de um pico largo e pouco intenso. No caso de micelas não homogêneas esse modelo teórico não descreve as curvas experimentais. Para as amostras aqui analisadas, a intensidade espalhada relativamente elevada das amostras não permite o ajuste de modelos específicos de sistemas micelares homogêneos. Beaucage e colaboradores (1995) desenvolveram uma equação geral que é capaz de descrever funções de espalhamento múltiplas separadas por diferentes regimes de leis de potência.

Assim, para determinar os parâmetros estruturais como raio de giro (**R_g**) e distância média entre as gotículas (**d**), as curvas de SAXS foram ajustadas utilizando a equação proposta por Beaucage (BEAUCAGE *et al.*, 1995).

$$I(q) = G \exp\left(\frac{-q^2 Rg^2}{3}\right) + B \left\{ \frac{\left[\operatorname{erf}\left(\frac{qRg}{\sqrt{6}}\right) \right]^3}{q} \right\}^p * S(q) \quad (1)$$

sendo \mathbf{G} a intensidade para q tendendo a zero relacionada à Lei de Guinier, \mathbf{B} é a constante de Porod, uma constante específica ao tipo de lei de potência descrita por Porod e o expoente P , conhecido como expoente de Porod é associado à morfologia da superfície das partículas (por exemplo, no caso de partículas de superfície lisa $P = 4$) e $\mathbf{S}(\mathbf{q})$ é o fator de estrutura. No caso de sistemas em que existe correlação entre gotículas esféricas, o fator de estrutura pode ser descrito pela seguinte equação:

$$S(q) = \frac{1}{1 + k \left[3 \frac{\text{sen}(qd) - qd \cos(qd)}{(qd)^3} \right]} \quad (2)$$

em que \mathbf{d} é distância média de correlação entre os objetos espalhadores e \mathbf{k} = é um fator de compactação, relacionado ao grau de empacotamento das gotículas que assume valores entre 0 e 5,92. Sistemas de esferas altamente compactas apresentam \mathbf{k} próximos de 5,92. Assim, quanto maior o valor de \mathbf{k} , maior o grau de empacotamento das gotículas, ou seja, mais próximas estão as gotículas.

A Figura 41 mostra o ajuste desse modelo feito pelo método dos mínimos quadrados a uma amostra representativa, onde a linha contínua representa o modelo teórico. Observa-se uma boa concordância entre o modelo teórico proposto por Beaucage e colaboradores (1995) e as curvas experimentais das ME contendo oleato de sódio e das ME contendo oleato e DOX.

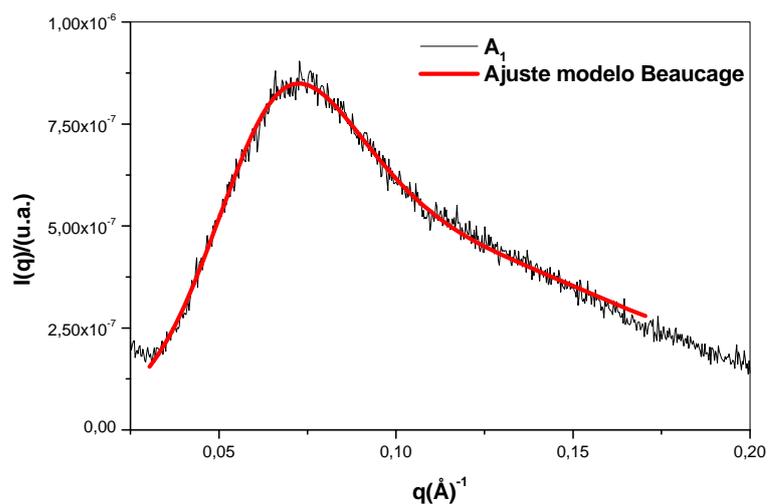


Figura 41 – Curva da intensidade de espalhamento $I(q)$ em função do vetor de espalhamento (q) para uma amostra representativa da região de microemulsão contendo oleato de sódio. A linha contínua representa o ajuste do modelo de Beaucage, o qual prevê a correlação entre as gotículas.

A partir do ajuste teórico observa-se a presença de um nível estrutural em valores de $q < 0,15 \text{ \AA}^{-1}$ deve-se a presença de agregados de gotículas primárias dispersas na fase líquida como mostra a Figura 39. Os parâmetros estruturais determinados para as amostras contendo oleato de sódio, com diferentes concentrações de colesterol e com DOX estão apresentados nas Tabelas 5 e 6, respectivamente.

Tabela 5 – Valores dos parâmetros estruturais obtidos a partir das curvas de SAXS para as formulações preparadas com concentração fixa de fase aquosa e aumento da concentração de CHO como fase oleosa.

<i>Formulações</i> <i>Sem DOX</i>	<i>[CHO] %</i>	<i>R_g (Å)</i>	<i>K</i>	<i>D(Å)</i>	<i>P</i>	<i>Tipo de fase</i>
<i>A₁</i>	1,5	38,0243	1,6948	83,2697	1,9962	Microemulsão
<i>A₂</i>	3	38,0927	0,8678	89,8298	1,9577	Microemulsão
<i>A₃</i>	5	35,4546	0,9613	88,1485	1,9095	Microemulsão
<i>A₄</i>	6	34,8435	0,3781	89,7898	1,8276	Microemulsão
<i>A₅</i>	7,5	32,7459	0,6745	130,2263	1,8365	Microemulsão

R_g = raio de giro das gotículas; k = fator de compacidade; d= distância entre as gotículas; P = inclinação de Porod.

Tabela 6 – Valores dos parâmetros estruturais obtidos a partir das curvas de SAXS para as formulações preparadas com concentração fixa de fase aquosa e aumento da concentração CHO, como fase oleosa contendo 2mg/mL de Doxorubicina.

<i>Formulações</i> <i>Com DOX</i>	<i>[CHO] %</i>	<i>R_g (Å)</i>	<i>K</i>	<i>d(Å)</i>	<i>a(Å)</i>	<i>P</i>	<i>Tipo de fase</i>
<i>A₁</i>	1,5	41,0522	1,36844	79,2388	-----	1,6605	ME
<i>A₂</i>	3	35,3108	1,0232	83,8886	-----	1,97753	ME
<i>A₃</i>	5	31,4978	1,9208	86,8173	194,2721	2,3677	ME + CHO Lamelar
<i>A₄</i>	6	32,5604	0,1215	82,5993	183,8138	2,3861	ME + CHO Lamelar
<i>A₅</i>	7,5	28,7729	0,8930	84,0677	137,7148	2,5182	ME + CHO Lamelar

R_g = raio de giro das gotículas; k = fator de compacidade; d= distância entre as gotículas; a= parâmetro de rede; P = inclinação de Porod.

Nota-se de maneira geral que para os sistemas contendo oleato de sódio em que a concentração de colesterol é de 1,5 a 7,5% (Tabela 5) o raio de giro das gotículas primárias (R_g) manteve-se praticamente constante, o fator de empacotamento (k) diminuiu e a distância média entre as gotículas (d) aumenta com o aumento da concentração de colesterol. Esses resultados sugerem que a adição de colesterol nessas concentrações promove a desagregação ou a formação de estruturas menos compactadas, aumentando a distância média entre as gotículas primárias levando a uma separação entre elas e diminuindo o fator de empacotamento.

Por outro lado, quando a DOX é incorporada (Tabela 6), de forma geral, o raio de giro das gotículas primárias (R_g) e o fator de empacotamento (k) diminuíram, porém a distância média entre as gotículas (d) mantém-se praticamente constante com o aumento da concentração de colesterol associada à DOX mostrando que a incorporação do fármaco favorece ainda mais a desagregação ou a formação de estruturas menos compactadas, diminuindo o grau de empacotamento como mostra a formulação A₄ (Tabela 6). O fato do colesterol cristalizar leva a um novo aumento do grau de empacotamento (A₅, Tabela 6), uma vez que o colesterol promove um maior empacotamento das moléculas do fosfolípido (Fosfatidilcolina de soja) e induz à formação de uma estrutura mais organizada e com menor mobilidade (TIROSH *et al.*, 1997). Esse fato também pode ser comprovado pela fotomicrografia conforme mostra a Figura 31 e pela difração de Raio-x (item 5.1.4, Figura 47).

Estruturas cristalinas ou líquidas cristalinas são caracterizadas em uma curva de SAXS pelo aparecimento de picos finos e bem definidos. Se um suficiente número desses picos é observado, a relação entre as distâncias relativas a esses picos ($d = 2\pi/q_{m\acute{a}x}$, $q_{m\acute{a}x}$ = valor de q relativo ao máximo do pico) inequivocamente revela a periodicidade da estrutura. Quando essa condição não é observada, por exemplo, quando apenas um ou dois picos estão presentes, não é possível determinar com precisão o arranjo das mesofases (cúbicas, lamelares e hexagonais) (URBAN, 2004) sendo necessário associar outras técnicas tais como fotomicrografia de luz polarizada, difração de raio X, entre outras.

A fase lamelar é caracterizada por uma seqüência equidistante de reflexões $q_n = 2\pi n/L$, no qual $n = 1,2,3,\dots$ e L é o período lamelar. As posições de reflexão seguem uma seqüência $n^{1/2}$ (URBAN, 2004). Esta fase lamelar (designada L_α) é formada por camadas paralelas e planares de bicamadas de tensoativo separadas por camadas de solvente, formando uma rede unidimensional (EZRAHI *et al.*, 1999).

Assim, as curvas de SAXS mostram a presença de dois picos nas seguintes formulações A₃, A₄ e A₅ com oleato de sódio contendo doxorrubicina (Figura 40), B₃, B₄ e B₅ sem oleato de sódio contendo apenas colesterol (Figura 42) e sem oleato de sódio contendo colesterol e doxorrubicina (Figura 43). Este comportamento sugere uma evolução estrutural com o aumento da quantidade de fase oleosa (colesterol) visto que conforme a proporção de colesterol aumenta associada à DOX, um segundo pico começa a ser observado conforme mostra Figura 43. Entretanto, os resultados das curvas de SAXS das Figuras 42 e 43 mostram que a formação desse segundo pico é favorecida principalmente na ausência de oleato de sódio (Figura 42) e com a incorporação da DOX no sistema (Figura 43). As curvas de SAXS associadas às fotomicrografias (Figuras 34 a 37) revelam no caso das amostras sem oleato de sódio que esses dois picos correspondem a uma distância d_{hk} (distância entre os planos de índice de Miller hkl), em que h e k são os índices de Miller 1 0 e 1 1 para os picos 1 e 2, respectivamente sugerindo uma estrutura lamelar bidimensional. O valor da razão entre as distâncias relativas ao primeiro e ao segundo picos calculado é cerca de 2, característico de periodicidade lamelar (Figuras 40, 42 e 43).

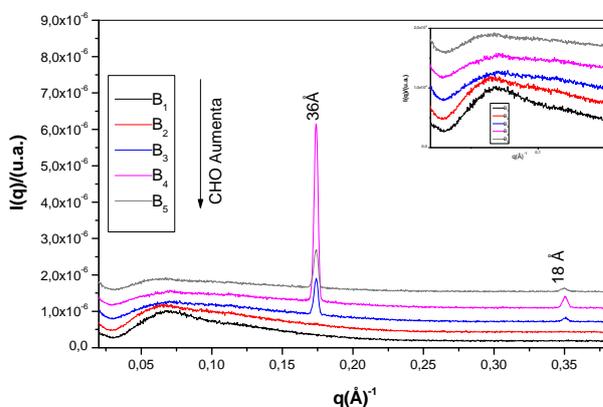


FIGURA 42. Evolução estrutural das ME estabilizada com 17, 14, 10, 8 e 5% de EU/FS (1:1), contendo 3, 6, 10, 12 e 15% de CHO, como fase oleosa e 80% de fase aquosa, respectivamente.

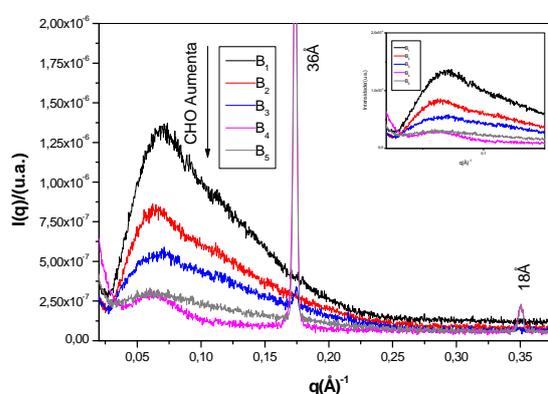


FIGURA 43. Evolução estrutural das ME estabilizada com 17, 14, 10, 8 e 5% de EU/FS (1:1), contendo 3, 6, 10, 12 e 15% de CHO, como fase oleosa e 80% de fase aquosa e 2mg/mL de Dox, respectivamente.

Dessa maneira, pode-se calcular para todas as formulações de fase lamelar o parâmetro de rede (a) através da equação (URBAN, 2004):

$$a = \frac{2\pi n}{q_{m\acute{a}x}} \quad (3)$$

sendo a o parâmetro de rede, $n = 1, 2, 3, \dots$ e $q_{\text{máx}}$ são os valores de q que correspondem a posição dos diferentes picos de difração.

O parâmetro de rede (a) é a distância entre as lamelas, dessa forma pode-se observar para as formulações B₃, B₄ e B₅ sem oleato de sódio contendo apenas colesterol (Tabela 7) e sem oleato de sódio contendo colesterol e doxorrubicina (Tabela 8) que o a mantém-se constante, fato esperado já que não existe um sistema lamelar líquido-cristalino em que uma fase aquosa ou oleosa estaria no interior das lamelas. No caso das amostras sem oleato de sódio, o arranjo lamelar é sempre formado pelo colesterol na fase lamelar e a manutenção constante significa que nenhuma substância encontra-se intercalada entre as lamelas de colesterol. Esse fato pode ser confirmado pela difração de raios-X apresentada pelas Figuras 45 e 46, discutidas de forma mais detalhada no item a seguir que mostram a cristalização do colesterol a medida que sua concentração aumenta além dessa cristalização ser ainda mais favorecida a medida que a DOX é adicionada ao sistema (Figura 46).

Para as formulações A₃, A₄, A₅ contendo oleato de sódio (Tabela 6) o parâmetro de rede diminui significativamente com o aumento da concentração de colesterol associada à incorporação de DOX no sistema. Esta diminuição ocorre devido a uma estruturação mais intensa das paredes do objeto primário da fase lamelar (colesterol), mostrando que o tipo de arranjo formado é diretamente depende da composição dos sistemas, tal como a presença do colesterol e da doxorrubicina e a razão entre os componentes (fase oleosa e tensoativos).

As curvas de SAXS das microemulsões sem oleato de sódio contendo somente colesterol (Figura 42) e CHO associado à DOX (Figura 43) também mostram a existência de uma hierarquia estrutural consistindo de dois níveis. O primeiro nível estrutural (valores de $q < 0,15 \text{ \AA}^{-1}$) que se deve a presença de agregados de gotículas primárias disperso na fase líquida. O segundo nível estrutural (valores de $q > 0,15 \text{ \AA}^{-1}$) constituído por um arranjo de estrutura lamelar bidimensional correspondente à cristalização do colesterol, confirmada pelos dados de difração de raios X apresentados nas Figuras 45 e 46. Como prevê a literatura (STIDDER *et al.*, 2005), a cristalização do colesterol é ainda mais favorecida na ausência do oleato de sódio (Figura 42) e quando a DOX é incorporada ao sistema (Figura 43).

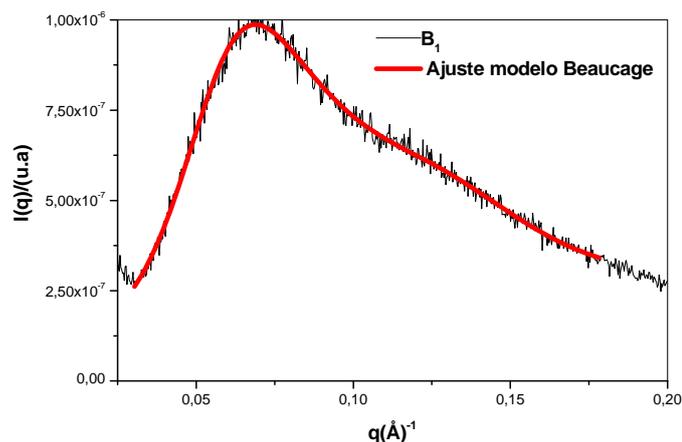


Figura 44 – Curva da intensidade de espalhamento $I(q)$ em função do vetor de espalhamento (q) para uma amostra representativa da região de microemulsão sem oleato de sódio. A linha contínua representa o ajuste do modelo de Beaucage, o qual prevê a correlação entre as gotículas.

O ajuste do modelo teórico de Beaucage e colaboradores (1995) (representado pela linha contínua) na Figura 44 revela que o modelo também propicia uma boa descrição das curvas experimentais para curvas das ME sem oleato de sódio contendo colesterol e das ME a qual a DOX foi incorporada. Por esse ajuste os parâmetros estruturais foram calculados (Tabelas 7 e 8), revelando que as interações existem e o grau de compactação varia com a porcentagem de fase oleosa, no caso o colesterol e com a incorporação de DOX no sistema assim como foi demonstrado nos sistemas contendo oleato de sódio e com DOX conforme mostra Tabelas 5 e 6, respectivamente.

Os parâmetros estruturais determinados para as amostras sem oleato de sódio, com diferentes concentrações de colesterol e com DOX estão apresentados nas Tabelas 7 e 8, respectivamente.

Tabela 7 – Valores dos parâmetros estruturais obtidos a partir das curvas de SAXS para as formulações preparadas com concentração fixa de fase aquosa e aumento da concentração CHO como fase oleosa.

<i>Formulação</i> <i>Sem DOX</i>	<i>[CHO] %</i>	<i>R_g(Å)</i>	<i>K</i>	<i>d(Å)</i>	<i>a(Å)</i>	<i>P</i>	<i>Tipo de fase</i>
<i>B₁</i>	3	38,3048	1,5564	88,8429	-----	1,6002	ME
<i>B₂</i>	6	36,7643	1,0018	88,4488	-----	1,0484	ME
<i>B₃</i>	10	33,5379	0,3243	87,6692	35,8676	0,6628	ME + CHO Lamelar
<i>B₄</i>	12	37,0579	0,8225	86,5841	35,8676	1,3870	ME + CHO Lamelar
<i>B₅</i>	15	38,4351	1,6477	100,7103	35,8676	1,4070	ME + CHO Lamelar

R_g = raio de giro das gotículas; k = fator de compacidade; d = distância entre as gotículas; a = parâmetro de rede; P = inclinação de Porod.

Tabela 8 – Valores dos parâmetros estruturais obtidos a partir das curvas de SAXS para as formulações preparadas com concentração fixa de fase aquosa e aumento da concentração CHO como fase oleosa contendo 2mg/mL de Doxorubicina.

<i>Formulações Com DOX</i>	<i>[CHO] %</i>	<i>R_g (Å)</i>	<i>K</i>	<i>d(Å)</i>	<i>a(Å)</i>	<i>P</i>	<i>Tipo de fase</i>
<i>B₁</i>	3	39,9056	0,9541	94,7270	-----	1,7344	ME
<i>B₂</i>	6	43,0616	1,1318	98,5664	-----	1,3598	ME
<i>B₃</i>	10	39,3405	0,8524	97,8632	35,8405	1,3814	ME + CHO Lamelar
<i>B₄</i>	12	38,4361	2,5557	79,5053	35,8676	1,2208	ME + CHO Lamelar
<i>B₅</i>	15	41,9125	0,2505	91,0423	35,8676	1,09376	ME + CHO Lamelar

R_g = raio de giro das gotículas; k = fator de compacidade; d = distância entre as gotículas; a = parâmetro de rede; P = inclinação de Porod.

As Tabelas 7 e 8 mostram de maneira geral que tanto para os sistemas sem oleato de sódio contendo somente o colesterol (Tabela 7) quanto para esses mesmos sistemas contendo doxorubicina (Tabela 8) o raio de giro das gotículas primárias (**R_g**) manteve-se praticamente constante. Já o fator de empacotamento (**k**) e a distância média entre as gotículas (**d**) diminuiu com o aumento da concentração de colesterol mostrando que a incorporação do colesterol e do fármaco favorece ainda mais a desestruturação do sistema, diminuindo o grau de empacotamento como mostra a formulação B₃ (Tabela 7 e 8). Na realidade, a cristalização do colesterol leva à formação de uma mistura de fases o que pode causar uma descontinuidade nos dados estruturais. Por outro lado, para formulação de B₅ (Tabela 8) que apresenta uma quantidade máxima de colesterol, cerca de 15%, e DOX incorporada ao sistema ocorre uma diminuição do fator de empacotamento (**k**) quando o fármaco é incorporado no sistema sugerindo que a adição de DOX ao sistema nessa concentração de colesterol promove a desestruturação do sistema, aumentando a distância média entre as gotículas primárias levando a uma separação entre as gotículas e diminuindo o fator de empacotamento

novamente. As medidas de SAXS associadas a técnicas como à microscopia de luz polarizada permitiram estudar as fases formadas pelas diferentes proporções de tensoativo e fase oleosa. Como dito anteriormente, a mistura de óleo, água e tensoativo é capaz de formar uma grande variedade de estruturas, como estruturas não cristalinas (microemulsões isotrópicas e emulsões) e cristalinas (fases lamelares, cúbicas e hexagonais). Nas primeiras, não há ordem orientacional nas interfaces, enquanto que nas segundas essa ordem é uma condição para sua formação (HYDE, 2001; KREILGAARD, 2002).

Os resultados das medidas de SAXS foram coerentes com os da microscopia de luz polarizada e difração de raio -X, indicando fases microemulsionadas, lamelares e cristalinas. Estes resultados permitem concluir que a estruturação do sistema é dependente da relação tensoativo/fase oleosa, sendo favorecida à medida que aumenta a concentração de CHO e quando a DOX é incorporada ao sistema.

Microemulsões e sistemas com estruturas cristalinas podem modificar profundamente a velocidade de liberação de fármacos, oferecendo benefícios que incluem o aumento da solubilidade e absorção e controle da biodisponibilidade de fármacos. Como sistema reservatório podem alterar os parâmetros farmacocinéticos, diminuindo a toxicidade e aumentando a eficácia clínica de fármacos (FORMARIZ *et al.*, 2005).

5.1.4 Difração de raio-X

A técnica de difração de raio X pode ser empregada para o estudo de sistemas que apresentam objetos com estrutura ordenada, em que os conjuntos paralelos formando um plano de reflexão tornam possível calcular a distância entre eles e determinar seu arranjo estrutural que são lamelares quando apresentarem picos correspondentes aos planos d_{100} e d_{200} (MERTA *et al.*, 2001).

Esta técnica permite estudar amostras contendo seus planos de reflexão com valor mínimo do ângulo θ de 0,5, o que limita a medida da distância entre os planos para valores máximos inferiores a 50Å. No caso de sistemas contendo distâncias maiores, a técnica de SAXS é ideal (CHEN *et al.*, 1995).

Assim, a difração de raios X pela matéria foi utilizada tanto para caracterizar se o sistema era amorfo ou cristalino, além do grau de cristalinidade das amostras tendo como principal finalidade identificar a evolução estrutural das fases cristalinas formadas após a incorporação de colesterol e de DOX no sistema.

As microemulsões sem oleato de sódio contendo colesterol (Figura 45) mostram a evolução estrutural da fase cristalina dos difratogramas em função do aumento da concentração de colesterol no sistema. Nota-se que a estabilidade da proporção de uma fase amorfa do ponto de vista da difração de raios-X não permanece estável a medida em que aumenta a quantidade de colesterol no sistema. Essa cristalização se deve ao colesterol, pois observa-se que à medida que sua concentração aumenta o mesmo cristaliza promovendo uma reorganização do sistema formando colesterol na fase lamelar ou cristais de colesterol sugerindo uma possível interação hidrofóbica desse componente com o sistema. Esse fato pode ser confirmado pelas curvas de SAXS (Figura 42) e pela fotomicrografia de luz polarizada (Figura 34).

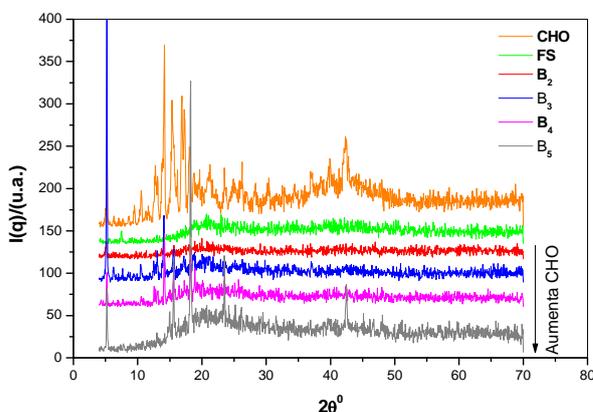


FIGURA 45. Evolução dos difratogramas das ME estabilizada com 14, 10, 8 e 5% de EU/FS (1:1), contendo 6, 10, 12 e 15% de CHO, como fase oleosa e 80% de fase aquosa, respectivamente.

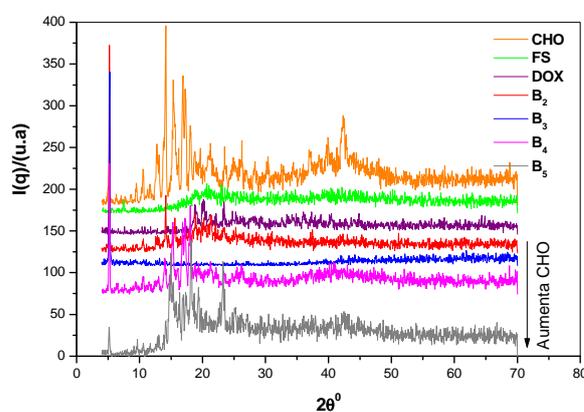


FIGURA 46. Evolução dos difratogramas das ME estabilizada com 14, 10, 8 e 5% de EU/FS (1:1), contendo 6, 10, 12 e 15% de CHO, como fase oleosa e 80% de fase aquosa e 2mg/mL de DOX, respectivamente.

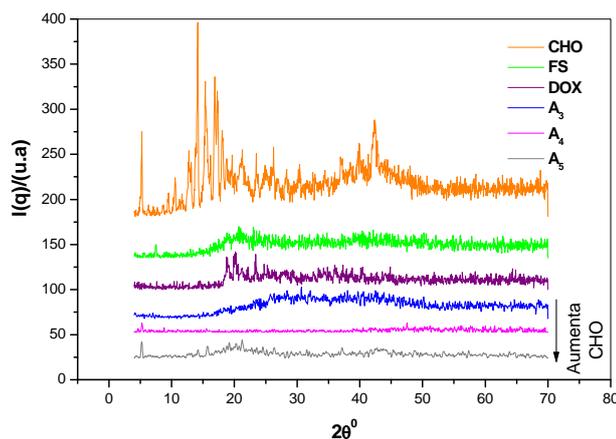


FIGURA 47. Evolução dos difratogramas das ME estabilizada com 15, 14 e 12,5% de EU/FS/OS (35:35:30 p/p), contendo 5, 6 e 7,5% de CHO como fase oleosa e 80% de fase aquosa e 2mg/mL de DOX, respectivamente.

Os resultados dos difratogramas das ME sem oleato de sódio contendo colesterol e DOX (Figura 46) e das ME com oleato de sódio contendo colesterol e DOX (Figura 47) mostram que a cristalização do colesterol é ainda mais favorecida quando o fármaco é incorporado ao sistema visto que os picos tornam-se mais intensos e menos alargados, semelhante ao de cristal de colesterol puro. Esse comportamento pode ser explicado pela associação do fármaco com a fase interna e a interface do sistema, favorecendo ainda mais a sua cristalização, principalmente quando ocorre o aumento da sua concentração devido a uma possível interação eletrostática entre o fármaco e o sistema tendo em vista que estes sistemas apresentam carga negativa e a DOX carga positiva em sua estrutura (FORMARIZ *et al.*, 2006). Esse fato também pode ser confirmado pela fotomicrografias de luz polarizada (Figuras 31 e 37, para as amostras com e sem oleato de sódio, respectivamente) e pela curvas de SAXS (Figuras 40 e 43, para as amostras com e sem oleato de sódio, respectivamente).

De forma geral, as interações fármaco-sistema desempenham um importante papel no controle da liberação. Entretanto, a razão de liberação de fármacos incorporados em sistemas com estrutura cristalina dependerá do grau e do tipo de estrutura cristalina formada assim como das características físico-químicas do fármaco. Essas propriedades tornam possível a utilização de sistema com estrutura cristalina como veículos carreadores de fármacos, os quais podem ser capazes de controlar a liberação das substâncias neles incorporados (GABBOUN *et al.*, 2001).

Como consequência da interação fármaco-sistema, sob certas condições, os fármacos solubilizados podem induzir mudanças no empacotamento molecular do sistema. Este efeito pode influenciar a razão de liberação “*in vitro*” (MULLER-GOYMANN e FRANK, 1986; IBRAHIM *et al.*, 1993; FARKAS *et al.*, 2001).

Os dados obtidos neste trabalho revelaram uma ótima concordância entre as diferentes técnicas utilizadas e permitiu associar o perfil de liberação “*in vitro*” mais lento da doxorrubicina (FORMARIZ *et al.*, 2008) à cristalização mais efetiva do colesterol nos sistemas preparados sem a adição de oleato de sódio conforme mostra a Figura 48.

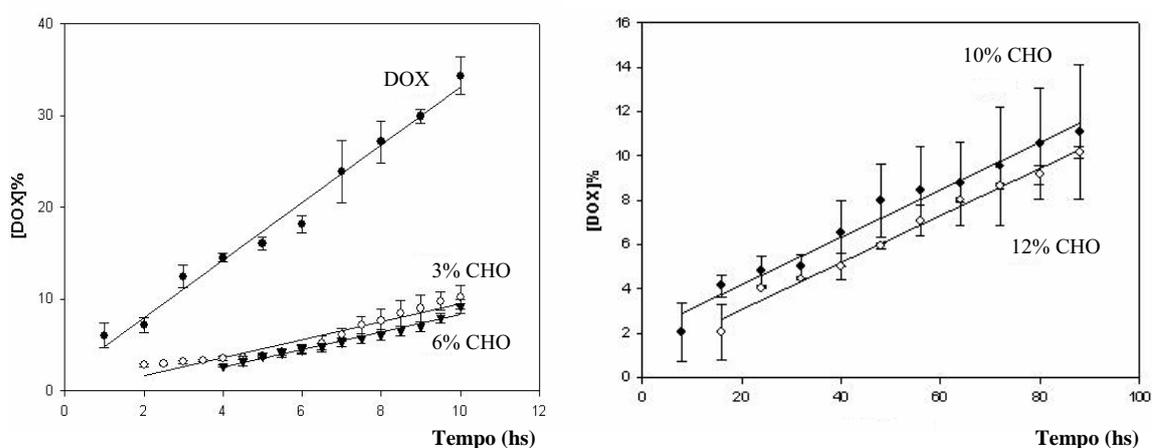


FIGURA 48. Perfil de liberação “*in vitro*” da doxorrubicina em microemulsões estabilizadas com EU/FS.

(FORMARIZ *et al.*, 2008)

5.1.5 Estabilidade dos Sistemas Microemulsionados

5.1.5.1 Características Macroscópicas dos Sistemas Microemulsionados

A literatura relata que quando se modifica progressivamente a composição de uma mistura de solventes imiscíveis, as mudanças que produzirão na dispersão coloidal podem ser traduzidas por importantes variações nas propriedades termodinâmicas dos componentes que a compõe (OLIVEIRA *et al.*, 2004).

Dessa maneira, a caracterização macroscópica dos sistemas microemulsionados pode ser uma ferramenta importante para avaliar as microemulsões. A partir desse dado associado a técnicas de reologia, viscosidade aparente, fluência – relaxação, módulo de perda e estocagem, microscopia de luz polarizada, espalhamento de luz a baixo ângulo (SAXS) e

difração de raio-X, pode-se escolher a microemulsão cuja a viscosidade, o diâmetro das gotículas e a forma microestrutural é mais apropriada para o fármaco ser incorporado servindo de base para os estudos farmacológicos e toxicológicos.

Os resultados apresentados nas Figuras 49-56 foram determinados visualmente, contra fundo escuro. As Figuras a seguir diferem entre si pela proporção de tensoativos e de fase interna oleosa utilizados para obter os sistemas selecionados. A composição de cada ME está descrita na metodologia (Tabelas 2 e 3).

De acordo com as fotografias das ME (Figuras 49, 50, 53 e 54) e das ME - DOX (Figuras 51, 52, 55 e 56) foi possível observar o predomínio de sistemas microemulsionados líquidos devido ao sistema conter 80% de fase aquosa. Além disso, também foi possível observar que as amostras A₁, A₂, A₃, A₄ (Figura 49 e 51) apresentaram-se transparentes ou semi-transparentes após o recente preparo. Fato esperado uma vez que o diâmetro da gotícula desses sistemas varia na ordem de $62,4 \pm 0,3$ a $91,3 \pm 0,6$ nm e de $96,1 \pm 1,3$ a $215,2 \pm 2,3$ nm para as ME contendo OS e para as ME contendo OS e DOX, respectivamente (FORMARIZ *et al.*, 2006) característico de sistemas microemulsionados que são definidos como sistemas isotrópicos, transparentes ou semi-transparentes (ABOOFAZELI *et al.*, 2000; MO *et al.*, 2000) com diâmetro de gotículas na ordem de 100-2000Å (FORMARIZ *et al.*, 2005).

Para obter esses sistemas microemulsionados (Figuras 49 e 51) utilizaram-se misturas de tensoativos com baixos e altos valores de EHL (Equilíbrio lipófilo – hidrófilo) na faixa de 4 (FS) a 18 (Oleato de Sódio) e de 4 (FS) a 15 (Eumulgin® HRE 40). A incorporação de oleato de sódio (Figura 49 a 51) no sistema proporcionou maior polaridade ao meio, favorecendo a incorporação de fase aquosa ao sistema. Fato que contribuiu para reduzir a tensão interfacial do sistema de maneira mais intensa, pois a incorporação do oleato de sódio reduz o parâmetro de empacotamento crítico da FS, por aumentar a hidrofília da mistura tensoativa, permitindo uma maior flexibilidade do filme interfacial para obter a curvatura necessária para a formação de gotículas na ordem de nanômetros favorecendo a estabilidade dos sistemas (ISRAELACHVILIE *et al.*, 1976; SHINODA *et al.*, 1991; TROTTA *et al.*, 1996; 2002).

Assim, a incorporação do oleato de sódio na mistura tensoativa (FS/EU) foi adequada uma vez que permitiu que a energia livre remanescente da interface do sistema se aproximasse de zero proporcionando sua melhor estabilidade termodinâmica que é dada pela seguinte equação (OLIVEIRA, 1997; LAWRENCE e REES, 2000; OLIVEIRA e SCARPA, 2001; OLIVEIRA *et al.*, 2004):

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

em que γ_i representa a tensão interfacial e ΔS o aumento da área interfacial.

Os resultados obtidos nas Figuras 49 e 51 também mostram que à medida que se aumenta a concentração de colesterol (1,5% a 7,5%) ocorre a transição de fases de sistemas líquidos transparentes a sistemas líquidos semi-transparentes e opacos. Esse fato provavelmente ocorre devido ao aumento da concentração de colesterol provocar um aumento no diâmetro das gotículas (FORMARIZ *et al.*, 2006) levando ao aumento gradativo da viscosidade aparente (Figura 14) observado para as formulações com oleato de sódio. O aumento lento da viscosidade é característico de um processo lento de estruturação do sistema, devido à agregação das partículas coloidais, levando ao aumento da turbidez (KORHONEN *et al.*, 2004). Esse aumento de turbidez é ainda mais evidente quando a DOX é incorporada no sistema (Figura 51).

Os dados das amostras A₁ a A₅ (Figuras 50 e 52) mostram que o aumento da turbidez e a alteração da coloração em virtude do tempo são mais favorecidos quando ocorre o aumento de CHO no sistema (1,5 - 7,5%) (Figura 50). Isso provavelmente ocorre devido a combinação do sistema tensoativo EU/FS/OS, não conseguir sustentar a tensão interfacial a valores baixos ou nulos a ponto de compensar a energia remanescente resultante da interface (BHARGAVA *et al.*, 1987; KEGEL *et al.*, 1999; LAWRENCE e REES, 2000), levando a instabilidade termodinâmica da ME que reflete diretamente no seu grau de opacidade. Porém, essas instabilidades são ainda mais favorecidas quando a DOX é incorporada ao sistema uma vez que essa sofre reações de oxidação em virtude do tempo, principalmente na presença de luz e temperatura, gerando como produto de degradação o 13-OH-doxorrubicinol (BOUKET *et al.*, 1987; CHABNER e CALABRESI, 2001) fato que pode ter contribuído para alterar a coloração dos sistemas estudados seis meses após o preparo (Figura 52).

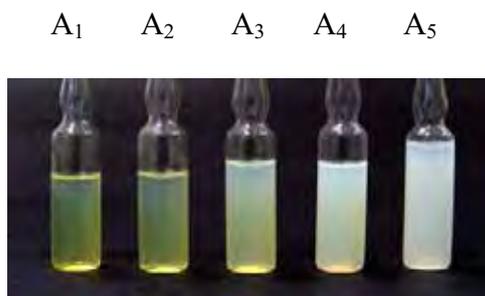


FIGURA 49. Microemulsões estabilizada com 18,5; 17; 15; 14 e 12,5% de EU/FS/OS (35:35:30 p/p), contendo 1,5; 3; 5; 6 e 7,5% de CHO como fase oleosa e 80% de fase aquosa, respectivamente. Sistemas fotografados após a preparação das ME.

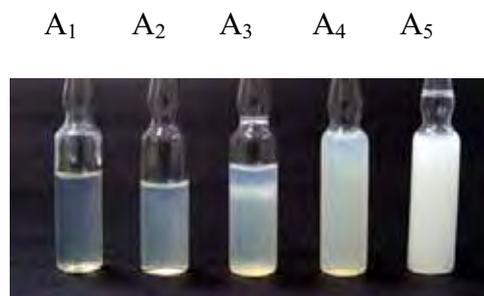


FIGURA 50. Microemulsões estabilizada com 18,5; 17; 15; 14 e 12,5% de EU/FS/OS (35:35:30 p/p), contendo 1,5; 3; 5; 6 e 7,5% de CHO como fase oleosa e 80% de fase aquosa, respectivamente. Sistemas fotografados seis meses após a preparação das ME.

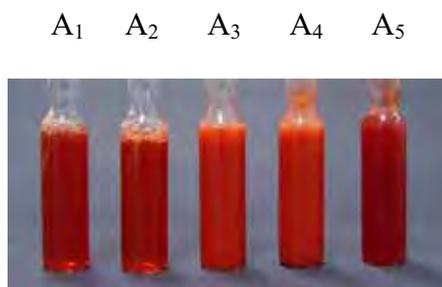


FIGURA 51. Microemulsões estabilizada com 18,5; 17; 15; 14 e 12,5% de EU/FS/OS (35:35:30 p/p), contendo 1,5; 3; 5; 6 e 7,5% de CHO como fase oleosa e 80% de fase aquosa e 2mg/mL de Dox, respectivamente. Sistemas fotografados após a preparação das ME .

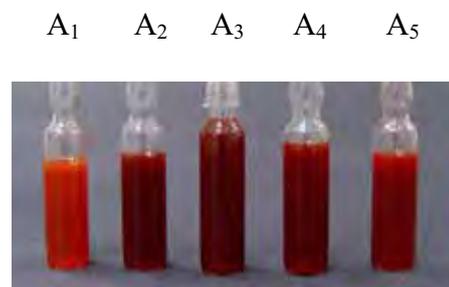


FIGURA 52. Microemulsões estabilizada com 18,5; 17; 15; 14 e 12,5% de EU/FS/OS (35:35:30 p/p), contendo 1,5; 3; 5; 6 e 7,5% de CHO como fase oleosa e 80% de fase aquosa e 2mg/mL de Dox, respectivamente. Sistemas fotografados seis meses após a preparação das ME, respectivamente.

O aumento da turbidez e da instabilidade dos sistemas (Figura 53 a 56) é ainda mais favorecido quando o oleato de sódio é retirado da ME aumentando ainda mais a concentração de CHO (6 a 15%) nessas amostras levando a formação de sistemas com EHL mais baixos, na faixa de 9,5 (FORMARIZ, 2004). Dessa maneira ocorre a transição de fases de sistemas líquidos transparentes a sistemas líquidos semi-transparentes e opacos, porém esses não se mantêm estáveis por 6 meses após o preparo (Figura 53 e 56), pois ocorre a cristalização do CHO na forma de bicamadas lamelares (Figuras 42 e 43) ou de cristais de CHO (Figuras 45 e 46), levando a formação de uma estrutura com menor mobilidade (STIDDER *et al.*, 2005), aumentando o tamanho das gotículas.

Em valores de EHL igual ou menor que 9,5 pode ser percebida a turvação e/ou separação das amostras (Figuras 53 a 56). Esse fato pode ser explicado em razão de que com a diminuição dos valores de EHL provocada pela retirada do OS do sistema há uma dificuldade

de levar a tensão interfacial para valores baixos ou nulos, o que provavelmente provoca a formação de gotículas de tamanhos intermediários entre emulsões e microemulsões conferindo opacidade ao sistema, além de restringir a região de transparência óptica e/ou levar a separação de fases. Esses sistemas com tamanho de gotículas intermediárias são denominados subemulsões (KAYSER *et al.*, 2003).

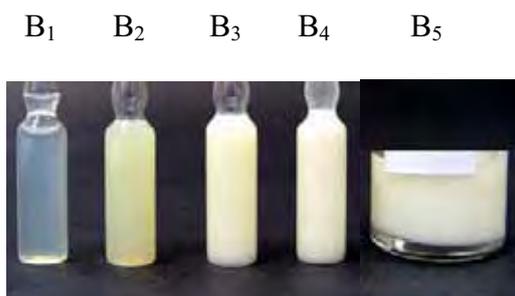


FIGURA 53. Microemulsões estabilizada com 17, 14, 10, 8 e 5% de EU/FS (1:1), contendo 3, 6, 10, 12 e 15% de CHO, como fase oleosa e 80% de fase aquosa, respectivamente. Sistemas fotografados após a preparação das ME.

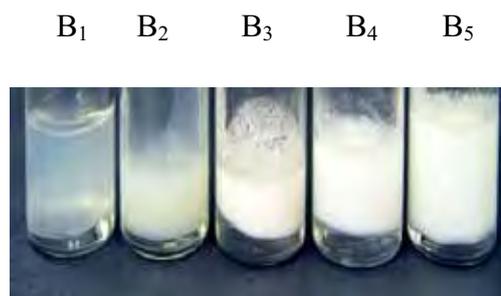


FIGURA 54. Microemulsões estabilizada com 17, 14, 10, 8 e 5% de EU/FS (1:1), contendo 3, 6, 10, 12 e 15% de CHO, como fase oleosa e 80% de fase aquosa, respectivamente. Sistemas fotografados seis meses após a preparação das ME.

Por outro lado, quando a DOX é incorporada ao sistema (Figuras 55 e 56) essa interage com as gotículas de óleo e com a interface que induz a formação de microestruturas mais volumosas favorecendo ainda mais a opacidade e/ou separação dos sistemas microemulsionados. Isso pode ser explicado pela interação DOX na interface dos sistemas, a qual possui uma estrutura volumosa, podendo perturbar a organização da interface, promovendo espaçamento entre as moléculas de tensoativo, sugerindo a formação de uma estrutura mais organizada (SON *et al.*, 2003), além de favorecer a cristalização do CHO (Figuras 40 e 43) levando ao aumento da viscosidade (Figura 21) e do tamanho das gotículas (Item 5.1.8.4) causando a turbidez (Figuras 55 e 56) ou a coalescência (Figura 56 (B₅)).

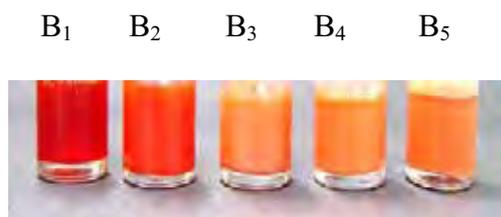


FIGURA 55. Microemulsões estabilizada com 17, 14, 10, 8 e 5% de EU/FS (1:1), contendo 3, 6, 10, 12 e 15% de CHO, como fase oleosa e 80% de fase aquosa e 2mg/mL de Dox, respectivamente. Sistemas fotografados após a preparação das ME.

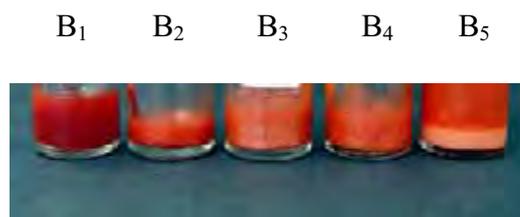


FIGURA 56. Microemulsões estabilizada com 17, 14, 10, 8 e 5% de EU/FS (1:1), contendo 3, 6, 10, 12 e 15% de CHO, como fase oleosa e 80% de fase aquosa e 2mg/mL de Dox, respectivamente. Sistemas fotografados seis meses após a preparação das ME.

Dessa maneira pode-se concluir que os dados das Figuras (49-56) sugerem que com o aumento da proporção de fase oleosa (CHO), a mistura tensoativa torna-se cada vez mais ineficaz na diminuição da tensão interfacial, assim a curvatura do filme interfacial não faz-se suficiente para conferir as gotículas da fase interna tamanho diminuto e as mesmas assumem um tamanho inerente a subemulsões conferindo ao sistema aspecto semi-transparente ou opaco. Além disso, é conhecido o papel fundamental dos tensoativos na estabilização das ME. Quando o número dessas moléculas aumenta por unidade de área, essas se comprimem desenvolvendo uma pressão bilateral. A tensão de superfície na interface diminui proporcionalmente com o aumento da pressão, podendo ser negativa (tensão negativa transiente da interface). O equilíbrio é conseguido quando a tensão negativa volta à zero (OLIVEIRA *et al.*, 2004). Esses fatos podem justificar as modificações ocorridas nos sistemas apresentados nas Figuras 50, 52, 54 e 56.

5.1.8.2 Ensaio turbidimétrico dos sistemas microemulsionados

A literatura mostra que a transparência apresentada pelos sistemas microemulsionados pode ser explicada pela capacidade do sistema tensoativo de diminuir a tensão interfacial entre a água e o óleo a ponto de formar estruturas de tamanhos nanométricos, ou seja, menores que $\frac{1}{4}$ do comprimento de onda da luz visível, que não desviam luz, caracterizando sistemas isotrópicos (OLIVEIRA *et al.*, 2004; FORMARIZ *et al.*, 2005). Para análise desse fenômeno nas amostras desenvolvidas (Tabelas 2 e 3) foi estudado o aumento do tamanho das gotículas após o preparo das amostras até um período de 15 dias, assim como a velocidade com que esse aumento ocorre.

Os resultados apresentados nas Figuras 57-60 foram determinados por espectrofotometria na região do visível, $\lambda = 410\text{nm}$, mostram a relação entre a turbidez das respectivas amostras em função do tempo (Figuras 57-60). Esses resultados demonstram que a turbidez do sistema aumenta lentamente com o tempo de estocagem (Figuras 57 a 60). Como a turbidez é proporcional a concentração das gotículas com tamanho suficiente para produzir espalhamento de luz, essa evolução observada pode estar relacionada ao aumento do tamanho de gotículas ou dos agregados (TOKUMOTO, 1996).

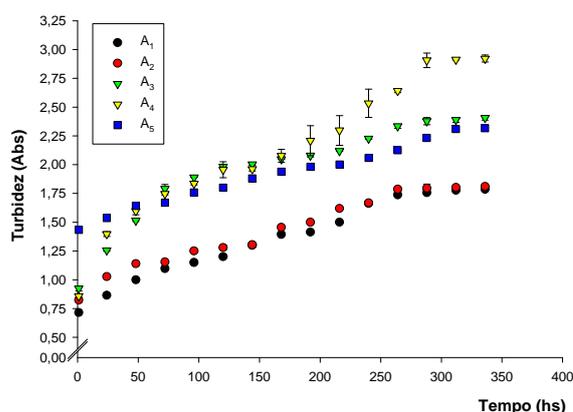


FIGURA 57. Turbidez das ME estabilizada com 18,5; 17; 15; 14 e 12,5% de EU/FS/OS (35:35:30 p/p), contendo 1,5; 3; 5; 6 e 7,5% de CHO como fase oleosa e 80% de fase aquosa, respectivamente. A_1 ($v = 3,21 \cdot 10^{-3} \text{ Abs/h}$), A_2 ($2,90 \cdot 10^{-3} \text{ Abs/h}$), A_3 ($v = 3,71 \cdot 10^{-3} \text{ Abs/h}$), A_4 ($5,46 \cdot 10^{-3} \text{ Abs/h}$), A_5 ($v = 2,53 \cdot 10^{-3} \text{ Abs/h}$).

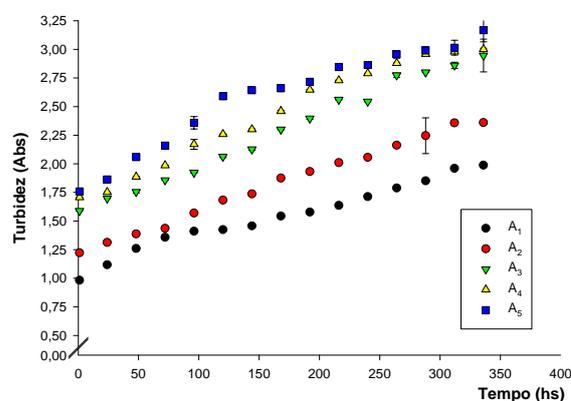


FIGURA 58. Turbidez das ME estabilizada com 18,5; 17; 15; 14 e 12,5% de EU/FS/OS (35:35:30 p/p), contendo 1,5; 3; 5; 6 e 7,5% de CHO como fase oleosa e 80% de fase aquosa e 2mg/mL de DOX, respectivamente. A_1 ($v = 2,71 \cdot 10^{-3} \text{ Abs/h}$), A_2 ($3,54 \cdot 10^{-3} \text{ Abs/h}$), A_3 ($v = 3,69 \cdot 10^{-3} \text{ Abs/h}$), A_4 ($4,24 \cdot 10^{-3} \text{ Abs/h}$), A_5 ($v = 3,98 \cdot 10^{-3} \text{ Abs/h}$).

Por outro lado, esse aumento da turbidez (Figura 57-60) de acordo com a literatura está diretamente relacionado à termodinâmica do sistema uma vez que foi fornecida energia as amostras através do uso do ultra-som para a obtenção dos sistemas microemulsionados. Assim, as amostras provavelmente estão entrando em equilíbrio termodinâmico, pois ainda há energia livre na interface óleo/água (FRANZINI, 2006) levando ao aumento do diâmetro das gotículas e assim, ao aumento gradativo da turbidez.

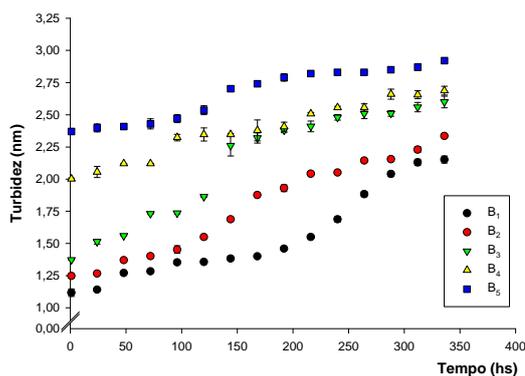


FIGURA 59. Turbidez das ME estabilizada com 17, 14, 10, 8 e 5% de EU/FS (1:1), contendo 3, 6, 10, 12 e 15% de CHO, como fase oleosa e 80% de fase aquosa, respectivamente. B_1 ($v= 3,11.10^{-3} Abs/h$), B_2 ($3,47.10^{-3} Abs/h$), B_3 ($v= 3,90.10^{-3} Abs/h$), B_4 ($2,05.10^{-3} Abs/h$), B_5 ($v= 1,82.10^{-3} Abs/h$).

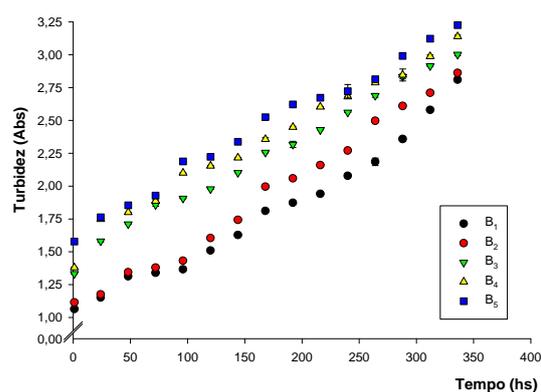


FIGURA 60. Turbidez das ME estabilizada com 17, 14, 10, 8 e 5% de EU/FS (1:1), contendo 3, 6, 10, 12 e 15% de CHO, como fase oleosa e 80% de fase aquosa e 2mg/mL de DOX, respectivamente. B_1 ($v= 4,92.10^{-3} Abs/h$), B_2 ($5,39.10^{-3} Abs/h$), B_3 ($v= 4,72.10^{-3} Abs/h$), B_4 ($4,70.10^{-3} Abs/h$), B_5 ($v= 4,72.10^{-3} Abs/h$).

As figuras as 57 a 60 também mostram que o crescimento de agregados é ainda mais favorecido quando o oleato de sódio é retirado da formulação (Figura 59) e quando o fármaco é incorporado ao sistema (Figura 58 e 60). Esse comportamento é típico da desestabilização de sistemas coloidais devido à diminuição do potencial eletrostático que pode ser associado ao crescimento do tamanho das gotículas ou dos agregados uma vez que o aumento da concentração de CHO e a incorporação de DOX nas ME leva a formação de estruturas mais compactadas sob condições lentas de agregação refletindo diretamente no aumento lento da turbidez. Esse fato pode ser confirmado pelas curvas de SAXS (Figura 40, 42-43) e pelas características macroscópicas (Figuras 49-56) das ME.

Entretanto, quando ocorre um aumento abrupto de colesterol no sistema (7,5% - ME - OS (A_5) e acima de 12% - ME sem OS (B_4 e B_5)) verifica-se a diminuição da turbidez em função do tempo (Figuras 57 a 60) sugerindo que adição dessas concentrações de CHO e de DOX nas ME promove a cristalização intensa do colesterol levando a diminuição da velocidade de crescimento desses agregados (item 5.1.8.3) e conseqüentemente, da turbidez.

5.1.8.3 Velocidade de Crescimento das Gotículas dos Sistemas Microemulsionados

Os meios dispersos apresentam a propriedade de espalhar ondas eletromagnéticas (como a luz), que venham atravessá-los. Este fenômeno depende do tamanho das gotículas que compõem o sistema disperso e do comprimento de onda utilizado. A diafanidade de um

meio pode ser utilizada para identificar as ME e estimar de forma grosseira o tamanho e a velocidade de crescimento das gotículas (FORMARIZ *et al.*, 2005).

Os resultados apresentados nas Figuras 61 e 62 mostram a relação entre a velocidade de crescimento das respectivas amostras em função do tempo, demonstrando que a velocidade de crescimento das gotículas aumenta com o aumento da fase oleosa do sistema (até 6% de CHO para as ME-OS e até 10% de CHO para as ME sem OS). Esse comportamento é mais acentuado quando o OS é retirado da formulação e a DOX incorporada no sistema (Figura 62).

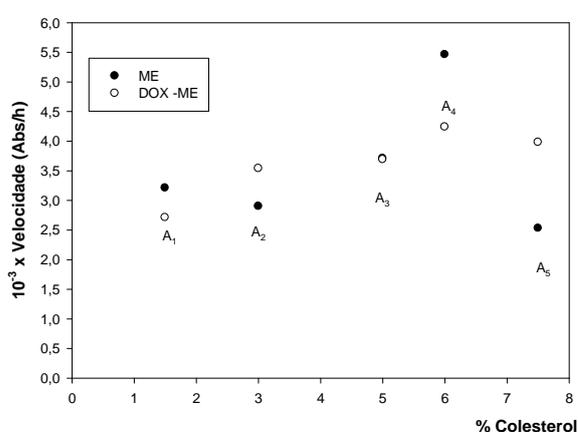


FIGURA 61. Velocidade de crescimento das gotículas das ME estabilizada com EU/FS/OS (35:35:30 p/p) contendo colesterol (n=3).

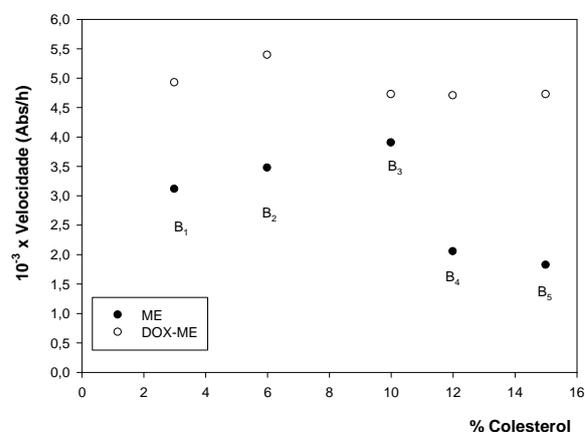


FIGURA 62. Velocidade de crescimento das gotículas das ME estabilizadas por EU/FS (1:1) contendo somente colesterol (n=3).

Os resultados de velocidade de crescimento das gotículas das ME (Figuras 61-62) sugerem que a máxima estabilidade das ME é alcançada quando obtém-se valores menores a de velocidade de crescimento das gotículas de fase interna é mais lento visto que essas ME estão entrando em equilíbrio termodinâmico devido a pressão transiente mínima gerada na interface óleo/água (FRANZINI, 2006) que leva ao aumento gradativo da velocidade de crescimento das gotículas (Figuras 61 e 62) e da turbidez (Figura 57-60). Pois, para formação espontânea dos sistemas microemulsionados, a tensão interfacial tende a estar próxima de zero (OLIVEIRA e SACARPA, 2001; FORMARIZ *et al.*, 2005).

Os resultados obtidos nas Figuras 61 e 62 mostram um aumento rápido da velocidade de crescimento das gotículas que é típico da formação de agregados densos menos ramificados (A₁ a A₄, Figura 61 e B₁ a B₃, Figura 62) (TOKUMOTO, 1996). Esse fato pode ser explicado pela característica do CHO associado à incorporação de DOX nessas ME

induzir a formação de CHO na forma lamelar (Figuras 30 e 31, 34 e 35), sendo esta estrutura menos rígida do que a estrutura de cristais CHO, fato que contribui para o aumento da velocidade de crescimento dos agregados e da turbidez dessas amostras em função do tempo; confirmando os resultados obtidos na Figuras 57-60.

Por outro lado, quando aumenta a concentração de colesterol no sistema (7,5% - ME - OS (A₅) e acima de 12% - ME sem OS (B₄ e B₅) associado ou não à incorporação de DOX verifica-se a diminuição da velocidade de crescimento das gotículas (Figuras 61 a 62) Esse fato deve-se à cristalização do CHO induzir a formação de uma estrutura mais organizada (cristais de CHO – Figuras 36 e 37), mais rígida e com menor mobilidade levando a diminuição da velocidade de crescimento desses agregados e da turbidez dessas amostras em função do tempo; confirmando os resultados obtidos nas Figuras (57 e 60).

5.1.8.4 Crescimento do Diâmetro das Gotículas dos Sistemas Microemulsionados

O fenômeno de dispersão da luz pelas microemulsões pode ser avaliado de maneira eficiente através da técnica de espalhamento de luz, a qual fornece informações diretas sobre o movimento translacional das gotículas da ME e permite o cálculo do crescimento do diâmetro das gotículas em função do tempo através de relações empíricas adequadas. Nota-se, no entanto, que se o sistema é concentrado, ou seja, quando a fase dispersa estiver em elevadas concentrações, a interpretação torna-se dificultada em razão de interações intergotículas. Para suprimir a interação entre gotículas a diluição do sistema microemulsionado com a fase dispersante é necessária (LYKLEMA, 1991; LAWRENCE e REES, 2000; ABOOFAZELI *et al.*, 2000; FORMARIZ *et al.*, 2005). Dessa maneira, as ME estudadas (Tabela 2 e 3) foram diluídas com fase aquosa, a qual representa a fase contínua do sistema.

A determinação do crescimento do diâmetro das gotículas das ME em função do tempo (Figuras 63 a 64) revela que os valores do raio hidrodinâmico aumentaram com o tempo, tendendo a estabilização em tempo infinito. Esse fenômeno pode ser explicado pela técnica de preparo das ME, pois envolveu a utilização de alta energia (ultra-som) a qual proporcionou valores de pressão transientes mínimos para a tensão interfacial. Quando o fornecimento de energia foi cessado o sistema tendeu ao equilíbrio energético levando ao aumento do raio hidrodinâmico (OLIVEIRA *et al.*, 2004) ao longo do tempo.

De acordo com os dados das Figuras 65 e 66, para o sistema estabilizado somente com EU/FS, como sistema tensoativo, ocorre variação no crescimento do diâmetro das gotículas das ME em função do tempo quando comparadas ao sistema estabilizado com a mistura

tensoativa EU/FS/OS (Figuras 63 e 64). Esses resultados (Figuras 65 e 66) mostram que o crescimento do diâmetro das gotículas é ainda mais favorecido quando o OS é retirado da formulação aumentando a concentração de CHO, com conseqüente diminuição da concentração do sistema tensoativo (EU/FS). Isso provavelmente ocorre devido à combinação do sistema tensoativo EU/FS, não conseguir sustentar o processo de emulsificação de maneira a tornar este mais eficiente, aumentando o tamanho e o crescimento das gotículas de óleo, diminuindo a estabilidade do sistema. Já que essa mistura tensoativa não consegue baixar a tensão interfacial de maneira suficiente a ponto de contrariar a energia remanescente resultante da interface (BHARGAVA *et al.*, 1987; KEGEL *et al.*, 1999; LAWRENCE e REES, 2000, OLIVEIRA e SCARPA, 2001).

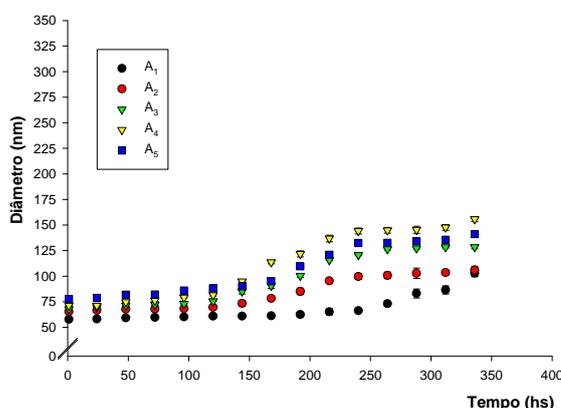


FIGURA 63. Diâmetro da gotícula das ME estabilizada com 18,5; 17; 15; 14 e 12,5% de EU/FS/OS (35:35:30 p/p), contendo 1,5; 3; 5; 6 e 7,5% de CHO como fase oleosa e 80% de fase aquosa, respectivamente.

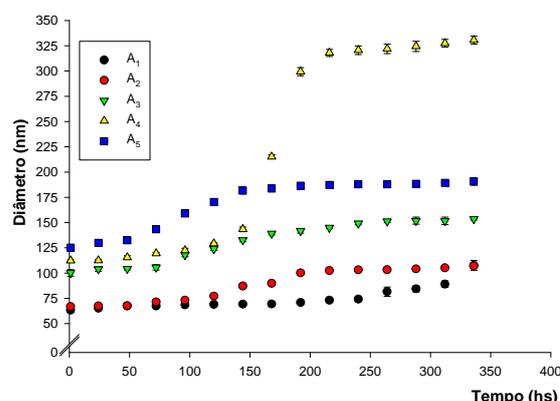


FIGURA 64. Diâmetro das gotículas das ME estabilizada com 18,5; 17; 15; 14 e 12,5% de EU/FS/OS (35:35:30 p/p), contendo 1,5; 3; 5; 6 e 7,5% de CHO como fase oleosa e 80% de fase aquosa e 2mg/mL de Dox, respectivamente.

Além disso, o aumento da concentração de CHO no sistema microemulsionado leva à transição de fases de CHO lamelar para cristais de CHO que contribui para um maior crescimento do tamanho das gotículas ou dos agregados ao longo do tempo (Figuras 62-66) aumentando a turbidez; confirmando assim, o que já foi demonstrado nas curvas de SAXS (Figura 42-43), nos difratogramas (Figuras 45-47) e nos ensaios de estabilidade tais como característica macroscópica (Figura 49-56) e turbidez (Figura 57-60).

Os resultados obtidos na Figura 63 mostram que quando a DOX é adicionada ao sistema com baixas concentrações de colesterol (1,5 a 3%) essa não afeta o raio hidrodinâmico do sistema microemulsionado. Esse fenômeno pode ser explicado devido à fração hidrofílica da DOX ser atraída para a região aquosa e os anéis hidrofóbicos dirigidos

para a fase oleosa (CHO) no interior da ME (SON *et al.*, 2003). Esta interação pode ser responsável pela diminuição do raio de curvatura das ME uma vez que nessas concentrações de CHO a incorporação da DOX no sistema não favorece a formação de cristais de CHO (Figura 40), levando a formação de gotículas com igual diâmetro, conforme foi observado na Figura 64.

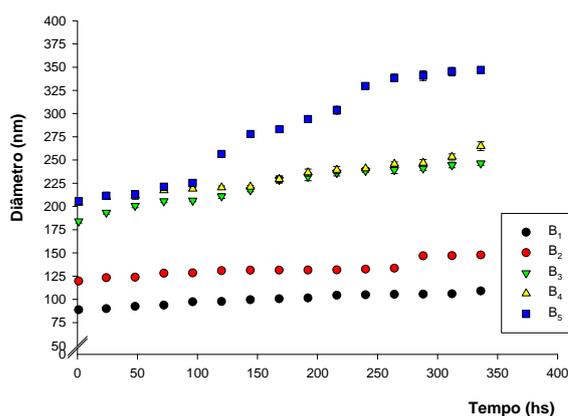


FIGURA 65. Diâmetro da gotícula das ME estabilizada com 17, 14, 10, 8 e 5% de EU/FS (1:1), contendo 3, 6, 10, 12 e 15% de CHO, como fase oleosa e 80% de fase aquosa, respectivamente.

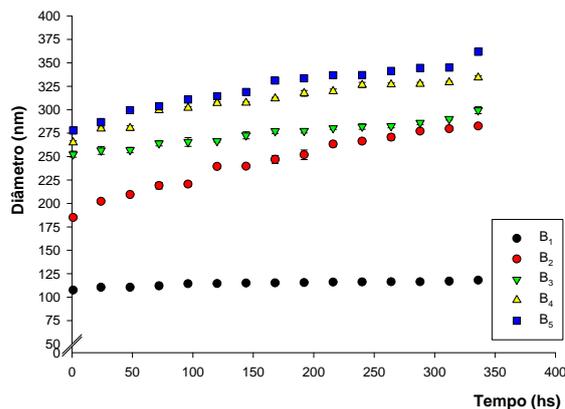


FIGURA 66. Diâmetro das gotículas das ME estabilizada com 17, 14, 10, 8 e 5% de EU/FS (1:1), contendo 3, 6, 10, 12 e 15% de CHO, como fase oleosa e 80% de fase aquosa e 2mg/mL de Dox, respectivamente.

Por outro lado, esse aumento do crescimento das gotículas ao longo do tempo fica mais evidente quando a DOX é incorporada nos sistemas sem (Figura 66) e com OS (Figura 64, com [CHO] acima de 5%). Isso pode ser explicado pela interação da DOX com o CHO e com a interface dos sistemas, a qual possui uma estrutura volumosa, podendo perturbar a organização da interface, promovendo o espaçamento entre as moléculas de tensoativo e a cristalização intensa do CHO, levando ao aumento do raio hidrodinâmico das gotículas (SON *et al.*, 2003).

De forma geral, devido ao potencial de aplicação das ME em indústria farmacêutica foi importante definir as características físico-químicas principalmente a estabilidade de cada um dos sistemas selecionados. Após esses estudos, torna-se necessário verificar se os sistemas são susceptíveis ao uso do ponto de vista de suas habilidades para liberação “*in vivo*” do fármaco encapsulado (FA *et al.*, 2004) e sob o ponto de vista toxicológico.

5.2 SISTEMAS ESCOLHIDOS PARA OS ENSAIOS TOXICOLÓGICOS, PARÂMETROS BIOQUÍMICOS E FARMACOLÓGICOS

Os sistemas escolhidos para os ensaios toxicológicos, parâmetros bioquímicos e farmacológicos foram as microemulsões estabilizadas com 18,5% EU/FS/OS (35:35:30 p/p) como sistema tensoativo, 1,5% de colesterol como fase oleosa e tampão Tris-HCl 0,01M pH 7,2, como fase aquosa (A_1) e com 17% da mistura tensoativa EU/FS (1:1 p/p), 3% de colesterol como fase oleosa e tampão Tris-HCl 0,01M pH 7,2, como fase aquosa (B_1), uma vez que esta fase foi utilizada como fase receptora nos experimentos do perfil de liberação “*in vitro*”, além da DOX apresentar uma boa solubilidade nesse valor de pH (FORMARIZ *et al.*, 2006; 2007; 2008). Esses sistemas microemulsionados foram escolhidos por apresentar baixa viscosidade, perfil de liberação prolongado (Figuras 48 e 67), além do diâmetro das gotículas estarem na faixa de $70,33 \pm 0,6$ nm e não estar na região de transição de fases sendo uma preparação adequada para administração parenteral (FORMARIZ *et al.*, 2006; 2007; 2008).

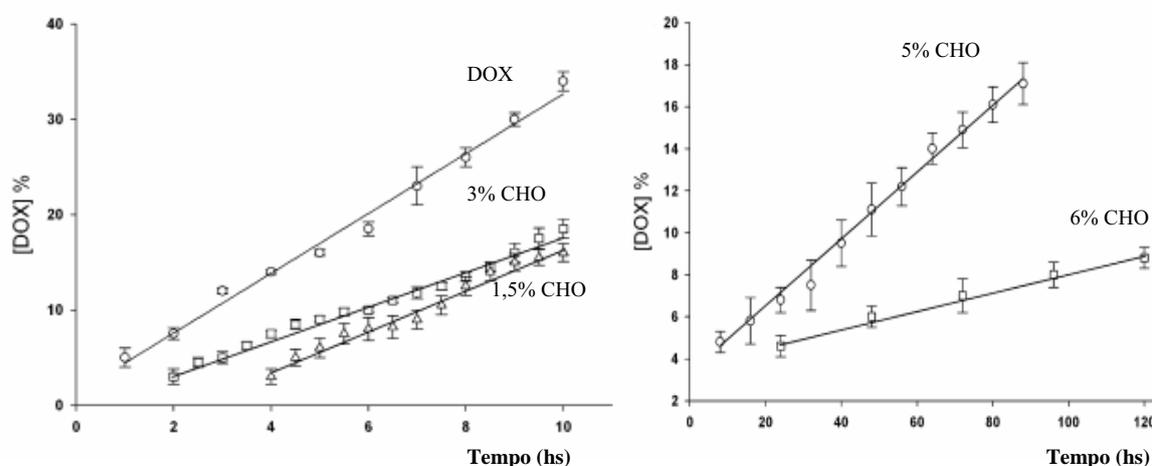


FIGURA 67. Perfil de liberação “*in vitro*” da doxorubicina em microemulsões estabilizadas com EU/FS/OS.

(FORMARIZ *et al.*, 2007)

5.2.1 AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE AGUDA

A avaliação toxicológica é de fundamental importância para eficácia terapêutica, pois este padrão visa à detecção e avaliação do potencial tóxico, para o homem, de qualquer substância ou produto químico acabado, ao qual possa estar exposto. 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, camundongos, o valor da DL_{50} é calculado (BIGHETTI *et al.*, 2004).

A dose letal média (DL_{50}) foi calculada pelo método estatístico de probitos, conforme metodologia apresentada por Litchfield e Wilcoxon (1949). Os resultados obtidos em todos os testes de toxicidade aguda com o cloridrato de doxorubicina, com as microemulsões contendo oleato de sódio incorporadas de doxorubicina e com as microemulsões contendo oleato de sódio incorporadas de doxorubicina em ratos e em camundongos estão descritos nas Tabelas 9–14. Essas microemulsões (Tabelas 2 e 3) foram administradas nos animais logo após o preparo.

A literatura mostra que a DL_{50} da doxorubicina, via intraperitoneal, foi de cerca de 21,9; 12,5 e 2,0 mg/Kg para camundongos, ratos e cães, respectivamente (BIOMOL, 2005). Os principais órgãos-alvo após dose única foram o sistema hemolinfopoiético e, especialmente em cães, o trato gastrointestinal. Outros órgãos afetados foram os rins, fígado e órgãos reprodutores masculino e feminino. A doxorubicina foi cardiotoxica em todas as espécies laboratoriais testadas. Foi genotóxica na maioria dos testes “*in vitro*” ou “*in vivo*” realizados; tóxica a órgãos reprodutores, embriotoxica em ratos e coelhos e teratogênica em ratos. Observou-se atrofia dos testículos em ratos e cães, além de mielossupressão em todas as espécies animais testadas. Não há informações sobre a administração de doxorubicina durante os períodos peri e pós-natal. A doxorubicina, como outras antraciclina e fármacos citotóxicos, foi carcinogênica em ratos (BIOMOL, 2005). Por outro lado, a DL_{50} do cloridrato de doxorubicina realizada em nosso laboratório, via intraperitoneal, foi de cerca de 9,05 mg/Kg e de 12,25 mg/Kg para ratos e camundongos, respectivamente. Esses valores aparentemente menores, quando comparado com o disponível na literatura (12,5mg/Kg para ratos e 21,9mg/Kg para camundongos) (BIOMOL, 2005), obtido em nosso experimento, pode ser explicado pela variabilidade entre os animais-testes uma vez que cada um apresenta uma reatividade individual, um débito cardíaco e um volume sistólico. Os resultados mostrados nas Tabelas 9 e 10 possibilitaram a determinação da dose letal média do cloridrato de doxorubicina.

TABELA 9 – Mortalidade de ratos *Wistar* que receberam o cloridrato de doxorubicina.

<i>Dose (mg/Kg)</i>	<i>Número de animais testados por grupo</i>	<i>Número de mortos</i>	<i>Mortalidade (%)</i>
7,5	5	0	0
8,0	5	1	40
10,0	5	4	80
15,0	5	5	100

$DL_{50} = 9,05 \text{ mg/Kg}$

Quando o cloridrato de doxorubicina foi administrado na dose igual ou superior a 8mg/kg para ratos (Tabela 9) e 10 mg/Kg para camundongos (Tabela 10) de peso corporal animal, os animais começaram a apresentar sinais de toxicidade. Estes sinais incluíram aparente piloereção, redução da atividade locomotora, sangramento das narinas e olhos, alterações do estado consciente e indisposição (diminuição da atividade geral) e em alguns casos a morte dos animais ocorreu aparentemente por parada cardiorespiratória.

Os animais que receberam o cloridrato de doxorubicina na dose inferior a 8mg/Kg para ratos (Tabela 9) e 10mg/Kg para camundongos (Tabela 10) de peso corporal animal, administrado via intraperitoneal, não apresentaram sinais de toxicidade durante os 14 dias de observação. Segundo Loomis (1974) compostos com esse valor de DL_{50} são considerados tóxicos.

TABELA 10 – Mortalidade de camundongos *Swiss* que receberam o cloridrato de doxorubicina.

<i>Dose (mg/Kg)</i>	<i>Número de animais testados por grupo</i>	<i>Número de mortos</i>	<i>Mortalidade (%)</i>
5	5	0	0
10,0	5	2	40
20,0	5	4	80
30,0	5	5	100

$DL_{50} = 12,25 \text{ mg/Kg}$

Os estudos de toxicidade aguda das microemulsões sem oleato de sódio contendo doxorrubicina mostram que a dose letal média das microemulsões, via intraperitoneal, foi cerca de 16,21mg/Kg (Tabela 11) e 32,10mg/Kg (Tabela 12) para ratos e camundongos, respectivamente mostrando que a ME estudada apresenta DL₅₀ 1,8 (ratos) e 2,6 (camundongos) vezes maior do que a forma farmacêutica convencional, no caso o pó liofilizado do cloridrato de doxorrubicina.

Dessa maneira, a ME estudada apresenta potencial terapêutico para ser administrada pela via parenteral uma vez que esses sistemas podem aumentaram o índice terapêutico da DOX, minimizando os efeitos adversos que este fármaco provoca, tais como cardiotoxicidade e mielossupressão, relacionados com a dose administrada (SACCO *et al.*, 2001; MITRA *et al.*, 2001). Essa diminuição dos efeitos adversos pode ser confirmada com os ensaios de parâmetros bioquímicos (item 5.2.2). Os resultados apresentados nas Tabelas 11 e 12 possibilitaram a determinação da dose letal média das ME sem oleato de sódio contendo DOX.

TABELA 11 - Mortalidade dos ratos *Wistar* que receberam as microemulsões sem oleato de sódio contendo doxorrubicina.

<i>Dose (mg/Kg)</i>	<i>Número de animais testados por grupo</i>	<i>Número de mortos</i>	<i>Mortalidade (%)</i>
12	5	0	0
15	5	2	40
18	5	3	60
20	5	5	100

DL₅₀ = 16,21mg/Kg

Os sinais e sintomas da intoxicação provocada pela microemulsões sem oleato de sódio contendo doxorrubicina iniciaram-se cerca de 72hs após a administração das diferentes doses (Tabela 11 e 12) do antineoplásico sendo os sinais e sintomas de início observados idênticos ao do cloridrato de doxorrubicina na dose superior ou igual a 15mg/kg para ratos e superior ou igual a 25mg/Kg para camundongos.

Por outro lado, os animais que receberam a ME sem oleato de sódio contendo doxorrubicina na dose inferior a 15mg/Kg para ratos (Tabela 9) e 25mg/Kg para camundongos (Tabela 10) de peso corporal animal, administrado via intraperitoneal não

apresentaram sinais de toxicidade durante os 14 dias de observação. Segundo Loomis (1974) compostos com esse valor de DL_{50} também são considerados tóxicos.

TABELA 12 - Mortalidade dos camundongos *Swiss* que receberam as microemulsões sem oleato de sódio contendo doxorubicina.

<i>Dose (mg/Kg)</i>	<i>Número de animais testados por grupo</i>	<i>Número de mortos</i>	<i>Mortalidade (%)</i>
20	5	0	0
25	5	1	20
40	5	4	80
70	5	5	100

$DL_{50} = 32,10\text{mg/Kg}$

Os estudos de toxicidade aguda das microemulsões com oleato de sódio contendo doxorubicina mostra que a dose letal média das microemulsões foi cerca de 25,39 mg/Kg para ratos (Tabela 13) e cerca de 54,65mg/Kg para camundongos (Tabela 14) mostrando que a ME estudada apresenta DL_{50} 2,8 (ratos) e 6 (camundongos) vezes maior do que a forma farmacêutica convencional, no caso o pó liofilizado contendo o cloridrato de doxorubicina. Entretanto quando se compara as ME com OS com a ME sem OS ambas contendo DOX essas apresentam um aumento de 1,56 (ratos) e 1,7 (camundongos) da DL_{50} . Os resultados apresentados nas Tabelas 13 e 14 possibilitaram a determinação da dose letal média das ME com oleato de sódio contendo DOX.

TABELA 13 - Mortalidade dos ratos *Wistar* que receberam as microemulsões com oleato de sódio contendo doxorubicina.

<i>Dose (mg/Kg)</i>	<i>Número de animais testados por grupo</i>	<i>Número de mortos</i>	<i>Mortalidade (%)</i>
20	5	0	0
25	5	3	60
30	5	4	80
35	5	5	100

$DL_{50} = 25,39\text{ mg/Kg}$

Esses resultados de toxicidade aguda para ratos e camundongos (Tabelas 13 e 14) corroboram com os resultados de estabilidade (Figuras 49 a 66) confirmando que a inclusão do OS na formulação melhora a estabilidade dos sistemas microemulsionados. Esse fato pode ser explicado pela associação do fármaco com a fase interna e a interface da ME, provocando a retenção da DOX nas gotículas, refletindo diretamente em um prolongamento da velocidade de liberação (Figura 67) o qual contribui para aumentar a dose letal média dessa ME conforme mostra nas Tabelas 13 e 14.

TABELA 14 - Mortalidade dos camundongos *Swiss* que receberam as microemulsões com oleato de sódio contendo doxorubicina.

<i>Dose (mg/Kg)</i>	<i>Número de animais testados por grupo</i>	<i>Número de mortos</i>	<i>Mortalidade (%)</i>
35	5	0	0
50	5	1	20
60	5	4	80
70	5	5	100

$DL_{50} = 54,65\text{mg/Kg}$

Os sinais e sintomas da intoxicação provocada pela microemulsões com oleato de sódio contendo doxorubicina iniciaram-se cerca de 72h após a administração das diferentes doses (Tabela 13 e 14) do antineoplásico sendo os sinais e sintomas de início observados idênticos ao do cloridrato de doxorubicina na dose superior a 20mg/kg para ratos e superior a 35mg/Kg para camundongos. Por outro lado, os animais que receberam a ME com oleato de sódio contendo doxorubicina na dose inferior ou igual a 20mg/Kg para ratos (Tabela 13) e 35mg/Kg para camundongos (Tabela 14) de peso corporal animal, administrado via intraperitoneal, não apresentaram sinais de toxicidade durante os 14 dias de observação. Segundo Loomis (1974) a ME com OS para ratos apresentou DL_{50} de 25,39mg/Kg (Tabela 13), portanto é considerada tóxica. Já para camundongos essa ME apresentou DL_{50} de 54,65mg/Kg (Tabela 14) sendo considerada moderadamente tóxica.

A literatura relata que a dose de medicamentos em animais também pode ser calculada pelo método de extrapolação alométrica que calcula e expressa doses utilizando a quantidade de fármaco (mg) por Kg consumido, e não só calculada e expressa como quantidade de fármaco por unidade de peso corporal (mg/Kg) (PACHALY e BRITO, 2001).

Os princípios dos resultados de extrapolação alométrica pressupõem que a variação dos parâmetros fisiológicos observados entre diferentes animais apresente a mesma proporcionalidade da variação dos parâmetros farmacocinéticos. Partindo dessa premissa utilizou-se os dados disponíveis de uma determinada espécie, no caso ratos *Wistar* em que foi feito estudos empíricos da DOX e da DOX-ME (Tabela 9, 11 e 13) e compatibilizando-se as diferenças através de fórmulas matemáticas, pode se determinar doses para o “animal-alvo” (camundongos *Swiss*) a partir das doses utilizadas em animais modelo (ratos *Wistar*) (PACHALY e BRITO, 2001).

Dessa forma, a taxa metabólica basal (TMB) pode, portanto ser utilizada para calcular a dose da DOX e da DOX-ME para o camundongo *Swiss* com base na dose estabelecida para o outro (ratos *Wistar*) considerando e ajustando as diferenças metabólicas entre os dois. As TMB para o animal modelo e para o animal alvo foram calculadas através da seguinte equação (PACHALY e BRITO, 2001):

$$TMB = K.M^{0,75}/M$$

em que **M** = massa corporal (Kg) e **K**= constante teórica, taxonômicamente dependente, baseada na temperatura média corporal do animal.

Os resultados obtidos neste estudo de toxicidade aguda mostraram que a DL₅₀ em camundongos foi cerca de 1,35, 1,98 e 2,15 (DOX, ME sem OS e ME-OS, respectivamente) vezes maior do que quando comparada em ratos (Figuras 68 e 69). Esse fato é esperado, pois a absorção, a distribuição, a metabolização e a eliminação da DOX e da DOX-ME ocorrem em função da taxa metabólica basal do animal. E a literatura mostra que os camundongos *Swiss* apresentam uma TMB maior do que os ratos *Wistar*, então os processos farmacocinéticos (distribuição, metabolização e eliminação) que contribuem para eliminação do fármaco é favorecido quando esse é administrado em camundongos. Portanto, uma dose letal média de 50 em mg/Kg só poderá ser usada para animais que absorvam, distribuam, metabolizam e excretam a DOX e a DOX-ME da mesma maneira (PACHALY e BRITO, 2001).

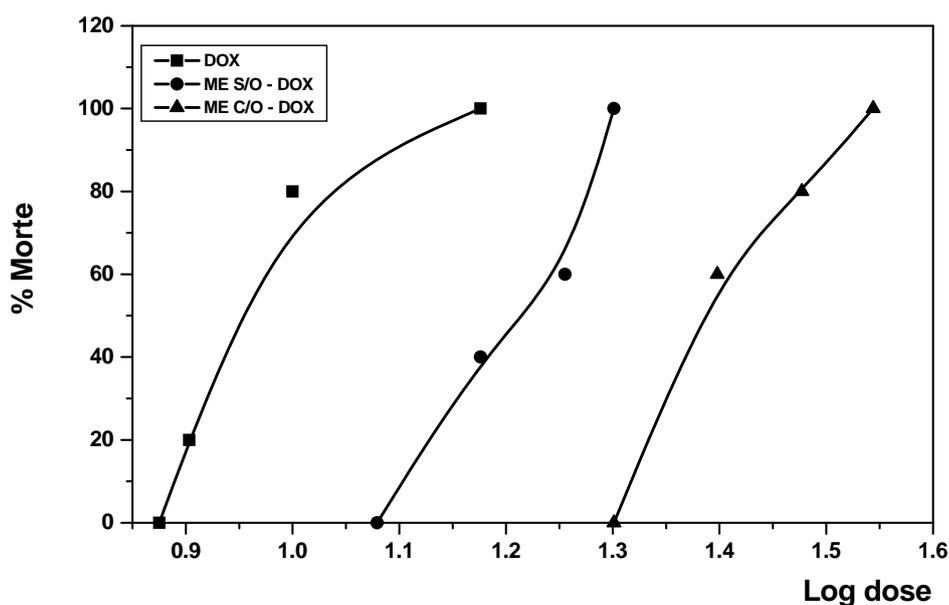


FIGURA 68 - Relação log da dose-resposta no teste de toxicidade aguda com o cloridrato de doxorubicina, microemulsões sem oleato de sódio contendo doxorubicina e microemulsões com oleato de sódio contendo doxorubicina, em ratos, via intraperitoneal.

De forma geral, os sistemas terapêuticos estudados (A_1 e B_1 , Tabelas 2 e 3) foram capazes de minimizar o efeito letal da DOX nas duas espécies de animais estudados (Figuras 68 e 69) sugerindo um possível aumento da eficácia terapêutica do antineoplásico, o que permite a redução da dose administrada uma vez que os efeitos adversos potenciais desse fármaco está diretamente relacionado à dose administrada conforme demonstrados nos itens 5.2.2 (Figuras 70-72) e 5.2.3 (Figuras 73 e 74).

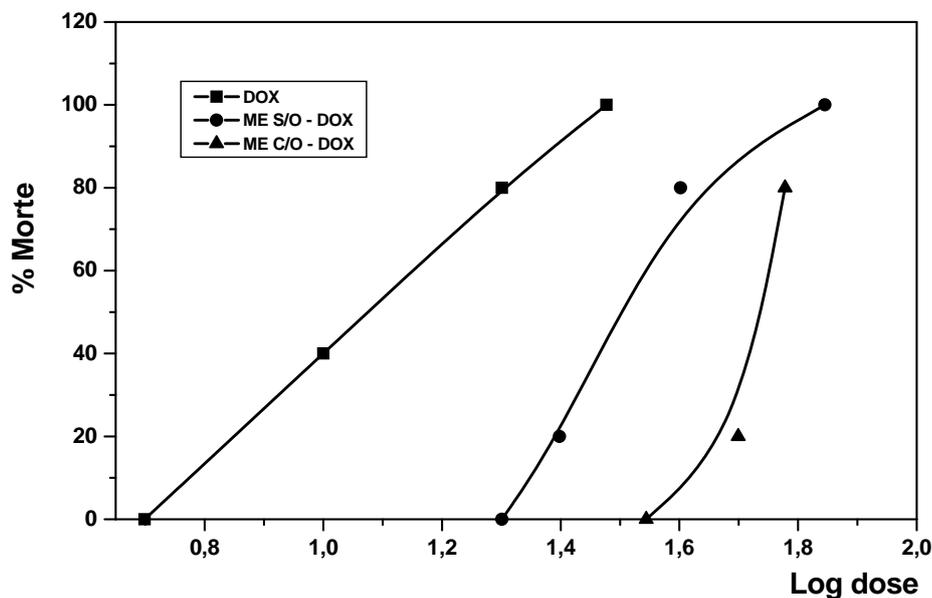


FIGURA 69 - Relação log da dose-resposta no teste de toxicidade aguda com o cloridrato de doxorubicina, microemulsões sem oleato de sódio contendo doxorubicina e microemulsões com oleato de sódio contendo doxorubicina, em camundongos, via intraperitoneal.

Neste contexto pode-se concluir que as ME estudadas foram adequadas a esses propósitos e foram utilizadas, visando à possível modificação da biodisponibilidade (Item 5.2.3, Figuras 73 e 74) e a diminuição da toxicidade aguda da doxorubicina (Figuras 68 e 69), funcionando como sistema reservatório que proporciona atividade terapêutica mais intensa e por tempo prolongado (Figuras 48 e 67).

5.2.2 PARÂMETROS BIOQUÍMICOS (AST, ALT E CKMB)

5.2.2.1 Determinação da atividade da isoenzima MB da creatinina kinase (CKMB)

A creatinina kinase (CK) é uma enzima citoplasmática e mitocondrial que catalisa a fosforilação reversível da creatinina com formação de ATP. A CK é composta de duas subunidades (M e B) que se combinam em três tipos: MM, MB e BB que são encontradas em maior proporção respectivamente, no músculo esquelético, cardíaco e nos tecidos. Elevações de MM são encontradas nas disfunções tireoideanas e BB nas doenças gastrointestinais, adenomas, carcinomas, doenças vasculares, autoimunes e cirrose. Portanto, a sua elevação não significa necessariamente lesão cardíaca (MELO, 2001; FERRAZ e ALVES, 2002).

Considerando as limitações da CK total, o CKMB é um marcador mais específico para detecção de lesões no miocárdio, pois 25 a 46% da concentração desta enzima encontram-se no músculo cardíaco e apenas 5% no músculo esquelético (MELO, 2001; FERRAZ e ALVES, 2002) sendo mais específica para danos cardíacos.

Após a lesão cardíaca, substâncias intracelulares passam para a circulação e suas concentrações no sangue dependem do tempo, da extensão, gravidade e caráter agudo das lesões celulares. A atividade enzimática e a concentração das proteínas na corrente sanguínea refletem normalmente um quadro atual. A velocidade (tempo) de aparecimento e de eliminação de cada um dos marcadores cardíacos no sangue é constante e específica, o que proporciona o estudo de sua sensibilidade e especificidade no diagnóstico (MELO, 2001; FERRAZ e ALVES, 2002).

Desde o final da década de 60 até os dias atuais, a doxorrubicina (DOX) tem sido amplamente utilizada no tratamento de neoplasias. Com o reconhecimento de sua potente atividade antineoplásica, observou-se que seus efeitos tóxicos são dose-dependentes e, também demonstrou-se que pode existir uma dissociação entre as manifestações clínicas, às vezes exuberantes, e os achados de necropsias com pouca expressão histológica e, outras vezes, discretas manifestações clínicas, apresentando severas alterações miocárdicas. Isto originou importante restrição clínica no tratamento de longo prazo pelo efeito tóxico cumulativo e, principalmente, potencial indutivo de cardiotoxicidade (SANTOS *et al.*, 1996; SAAD *et al.*, 2001; ITO *et al.*, 2001; HOU *et al.*, 2005).

A prevenção da miocardiopatia pela DOX tem sido objeto de numerosos estudos. Muitos esforços têm sido feitos para diminuir a toxicidade pela droga. Considerando-se que uma das mais importantes conseqüências do uso clínico da DOX é a falência cardíaca, provavelmente secundária ao acometimento direto do cardiomiócito, ou através de reações químicas que afetam a estrutura cardíaca (SANTOS *et al.*, 1996; SAAD *et al.*, 2001). Desenvolvimento de miocardiopatia e falência cardíaca congestiva após a administração de DOX tem sido mostrado em seres humanos (LEFRAK *et al.*, 1973, SANTOS *et al.*, 1996) e em vários animais (CZARNECKI *et al.*, 1986; SANTOS *et al.*, 1996; CHAKRABARTI *et al.*, 2001; HOU *et al.*, 2005).

Esta droga induz cardiotoxicidade em ratos, sendo que a disfunção miocárdica induzida pela DOX parece ser multifatorial (SANTOS *et al.*, 1996). Há evidências sugerindo a inibição do ácido nucléico e síntese protéica, a liberação de aminas vasoativas, anormalidades mitocondriais, distúrbios no transporte de cálcio, desequilíbrio eletrolítico, formação de radicais livres e peroxidação lipídica (SANTOS *et al.*, 1996, SAAD *et al.*, 2001,

ITO *et al.*, 2001, HOU *et al.*, 2005). Essa lesão cardíaca é caracterizada por aumento significativo dos níveis séricos do biomarcador CKMB em cerca de 4,8 vezes quando comparado com o grupo salina (SAAD *et al.*, 2001).

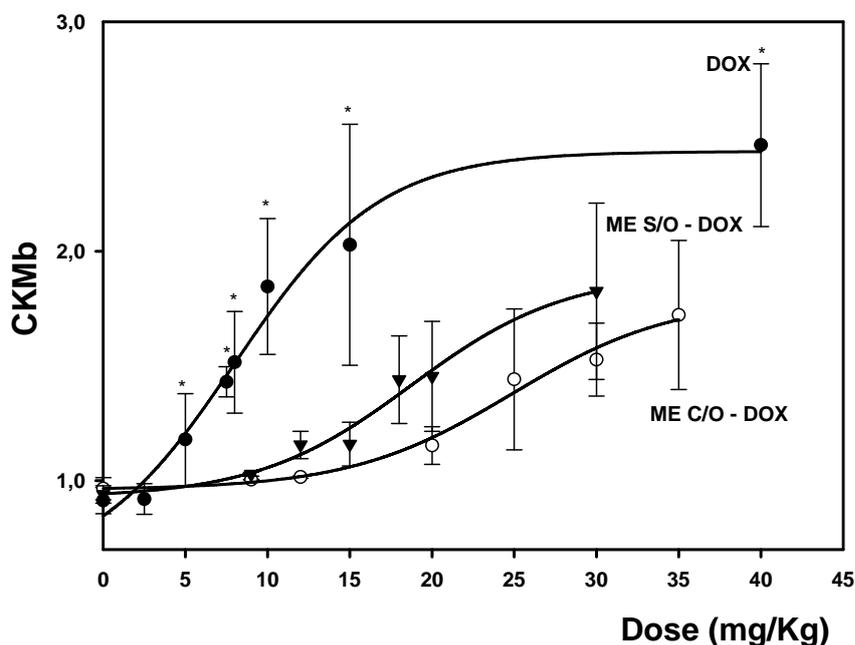
Dessa maneira, foi realizada a avaliação da isoenzima MB da creatinina kinase pré e pós tratamento com a doxorrubicina incorporada em microemulsões contendo oleato de sódio e microemulsões sem oleato de sódio tendo como objetivo comparar com a forma farmacêutica convencional (Cloridrato de Doxorrubicina, Eurofarma, Brasil) observando os possíveis danos cardíacos decorrentes a exposição à DOX e as ME - DOX.

O parâmetro bioquímico da isoenzima MB da creatinina kinase (CKMB) obtido através da determinação por método cinético Kit Labtest (*ref: 200404*) está demonstrado na Figura 70 através das razões de suas atividades pós-tratamento / pré-tratamento em função das doses administradas. A razão pós / pré-tratamento em cada grupo foi o parâmetro escolhido para realizarem-se as comparações entre os grupos.

Os resultados referentes ao nível médio da isoenzima MB mostraram que os grupos do cloridrato de doxorrubicina apresentaram elevações significativas ($p < 0,05$) na sua atividade enzimática em função da dose administrada e em relação ao grupo salina uma vez que a atividade enzimática da MB da creatinina kinase aumentou cerca de 2,70 vezes em relação ao grupo salina a medida que aumentou-se a dose administrada da DOX mostrando que o efeito cardiotoxícico da doxorrubicina é dose-dependente (Figura 70).

Esse efeito cardiotoxícico dose-dependente da DOX (Figura 70) pode ser confirmado pela literatura que mostra que causar cardiomiopatia é uma característica exclusiva dos antibióticos antraciclínicos, em especial, a doxorrubicina tendo em vista que a administração de altas doses pode aumentar o risco de cardiotoxicidade. Essa cardiotoxicidade é caracterizada por aumento dos níveis séricos do biomarcador CKMB (SAAD *et al.*, 2001, HOU *et al.*, 2005), fato também confirmado pela Figura 70.

A literatura também mostra que o aumento dos níveis séricos do biomarcador CKMB leva a mudanças histopatológicas no miocárdio de ratos tratados com doxorrubicina. Qualitativamente, os danos cardíacos induzidos pela DOX foram reconhecidos pela presença de edema intersticial marcado, de infiltração celular inflamatória crônica, de fibrose subendocardial focal, de fibrose miocárdial marcado, de inchaço e desorganização miocárdial marcado das fibras com vacúolo perinuclear e necrose miocárdial (SAAD *et al.*, 2001).



Dunn's Methods: * $p < 0,05$.

FIGURA 70: Razão pós-tratamento / pré-tratamento da CKMb em função da dose administrada.

O grupo dos animais tratados com os sistemas microemulsionados, recentemente preparados, incorporados de DOX contendo e não contendo oleato de sódio apresentaram uma diminuição significativa da atividade da isoenzima MB da creatinina kinase em cerca de 1,79 e de 1,31 vezes, respectivamente quando comparado com a DOX na forma farmacêutica convencional ($p < 0,05$). Porém, quando compara-se as ME com e sem oleato de sódio veiculando DOX o aumento dessa atividade não foi significativo ($p > 0,05$) (Figura 70) uma vez que ambos os sistemas estudados são ME ricas em CHO ($A_1 - 1,5\% \text{ CHO}$ e $B_1 - 3\% \text{ CHO}$ sem OS, Tabelas 2 e 3) e apresentam grau de estruturação (Figuras 14 a 47) e liberação (Figuras 48 e 67) semelhantes e portanto, diminuição da atividade de CKMB semelhantes ($p > 0,05$).

As análises dos resultados da Figura 70 também mostraram que as ME com e sem oleato de sódio contendo DOX não aumentaram a atividade de CKMB de modo significativo em relação ao grupo controle (microemulsões sem DOX) ($p > 0,05$) mostrando que os componentes utilizados contornarem problemas de toxicidade (KIBBE, 2000) (A_1 e B_1 , Tabelas 2 e 3). Esses sistemas ($A_1 - 1,5\% \text{ CHO}$ e $B_1 - 3\% \text{ CHO}$ sem OS, Figura 70) estudados estão contribuindo para a diminuição do efeito cardiotoxico da DOX uma vez que esses

sistemas atuam como sistema reservatório e, portanto liberam uma quantidade menor de DOX no fluido biológico quando comparado com o fármaco livre (Figuras 48 e 67).

Esses resultados de cardiotoxicidade representados pela diminuição dos níveis séricos do biomarcadores (Figura 70) nos sistemas microemulsionados (Tabelas 2 e 3) são esperados uma vez que essas ME aumentaram a DL₅₀ da DOX (Figura 68), aumentando seu índice terapêutico (Item 5.2.3) e mimizando, assim os efeitos adversos da DOX como a cardiotoxicidade (Figura 70). Esse fato pode ser sugerido devido a esses sistemas microemulsionados apresentarem uma redução da distribuição da DOX nos tecidos-alvos tais como coração, rim e fígado quando comparada com a DOX na forma farmacêutica convencional minimizando seu efeito adverso (WANG e QUINN, 2002) tal como o hepatotóxico (item 5.2.2.2, Figuras 71 e 72) e o cardiotoxíco (Figura 70).

Essa redução da distribuição da DOX nos tecidos cardíacos pode ser explicado pela associação do fármaco com o CHO (fase interna) e interface da ME provocando a retenção da DOX nas gotículas, diminuindo a liberação do fármaco (Figuras 48 e 67), assim como a sua distribuição sendo capazes de minimizar o efeito cardiotoxíco da DOX (Figura 70), diminuir a toxicidade aguda (Figura 68) e aumentar a eficácia terapêutica do antineoplásico (Item 5.2.3). Além disso, quando ocorre a incorporação de DOX nas gotículas de ME rica em CHO (A₁ e B₁, Tabelas 2 e 3), essas alteram a permeabilidade da célula tumoral, podendo aumentar o efeito antitumoral (Item 5.2.3), reduzindo a toxicidade potencial do fármaco sobre outros tecidos conforme demonstrado na Figura 70.

5.2.2.2 Determinação da atividade da aspartato amino transferase (AST) e da alanina amino tranferase (ALT)

As aminotransferases (ALT e AST) catalisam a transferência reversível de uma amina de um aminoácido para um cetoácido. Essas enzimas, geralmente, encaminham os grupos aminas de vários aminoácidos para o α -cetoglutarato, para a conversão em NH₄⁺ (STRYER, 1996; LEHNINGER, 2000; RIBEIRO *et al.*, 2006).

Essas enzimas estão presentes em elevadas concentrações no músculo, cérebro e fígado. A elevação da atividade das aminotransferases no sangue indica necrose ou moléstia, especialmente nesses tecidos (MURRAY *et al.*, 1994; RIBEIRO *et al.*, 2006).

Segundo Ockner (1993) a elevação dos níveis da ALT é relativamente específica da doença hepática. Apesar dos níveis de AST poderem estar aumentados nas doenças de outros órgãos valores mais de 10 vezes acima do limite superior de variação normal refletem

habitualmente uma patologia hepática ou biliar. Os valores das aminotransferases são úteis para monitorizar a evolução da hepatopatia parenquimal aguda ou crônica.

A ALT é encontrada principalmente no citoplasma do hepatócito, enquanto 80% da AST está presente na mitocôndria. Essa diferença tem auxiliado no diagnóstico e prognóstico de doenças hepáticas. Em dano hepatocelular leve a forma predominante no soro é a citoplasmática, enquanto em lesões graves há liberação da enzima mitocondrial, elevando a relação AST/ALT (MOTTA, 2003). Já, na hepatite por vírus ou tóxica, a ALT é caracteristicamente tão elevada ou até maior que a AST, e a relação ALT/AST (De Ritis), normalmente é menor que 1, aproxima-se ou torna-se maior que a unidade (BURTIS e ASHWOOD, 2001).

Neste contexto, deve-se ressaltar que o parâmetro ALT é mais específico a danos hepáticos em relação à AST. A ALT é específica ao fígado e a sua principal aplicação clínica dá-se na doença hepática parenquimatosa, enquanto que a AST também é encontrada no músculo esquelético, rins, coração e hemácias sendo que suas principais aplicações clínicas são em doença hepática parenquimatosa, doença muscular e no infarto do miocárdio (BURTIS e ASHWOOD, 2001).

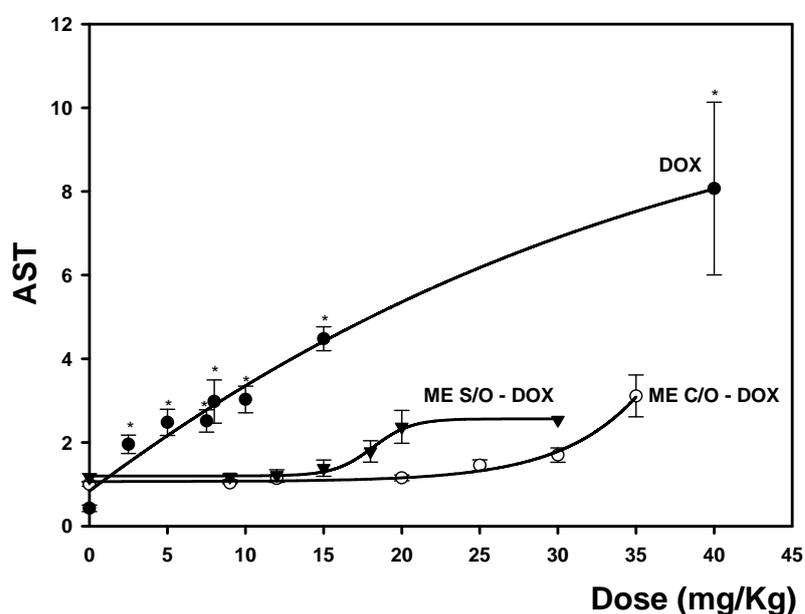
A literatura mostra que a lesão hepática induzida pela doxorubicina é conseqüência da indução de alterações peroxidativas em vários tecidos como, por exemplo, o fígado que é evidenciada pela elevação significativa na produção de malondialdeído (MDA) e pela depleção dos índices de glutatona (GSH) no tecidos do fígado dos ratos. Essa lesão hepática é caracterizada por aumento significativo dos níveis séricos dos biomarcadores ALT e AST em 2,85 e 2,3 vezes, respectivamente quando comparados ao grupo controle (salina) (SAAD *et al.*, 2001).

Dessa forma, foi realizada a avaliação das transaminases pré e pós tratamento com a doxorubicina incorporada em microemulsões contendo oleato de sódio e microemulsões sem oleato de sódio tendo como objetivo comparar com a forma farmacêutica convencional (Cloridrato de Doxorubicina, Eurofarma, Brasil) observando os possíveis danos hepáticos decorrentes a exposição à DOX e as ME - DOX.

Os parâmetros bioquímicos AST e ALT obtidos através da determinação por método cinético Kit Labtest (*ref: 06004*) e Kit Labtest (*ref: 140404*), respectivamente estão demonstrados nas Figuras 71 e 72 através das razões de suas atividades pós-tratamento / pré-tratamento em função das doses administradas. A razão pós / pré-tratamento em cada grupo foi o parâmetro escolhido para realizar-se as comparações entre os grupos.

Os resultados referentes aos níveis médios da aspartato aminotransferase (AST) e da

alanina aminotransferase (ALT) (Figuras 71 e 72) no plasma mostraram que os grupos do cloridrato de doxorrubicina apresentaram elevações significativas ($p < 0,05$) nas suas atividades em função da dose administrada e em relação ao grupo salina uma vez que a atividade enzimática das transaminases AST e ALT aumentaram em cerca de 18,88 e de 9,53 vezes, respectivamente em relação ao grupo salina a medida que aumentou-se a dose administrada da DOX mostrando que o efeito hepatotóxico da doxorrubicina é dose-dependente.



Dunn's Methods: * $p < 0,05$.

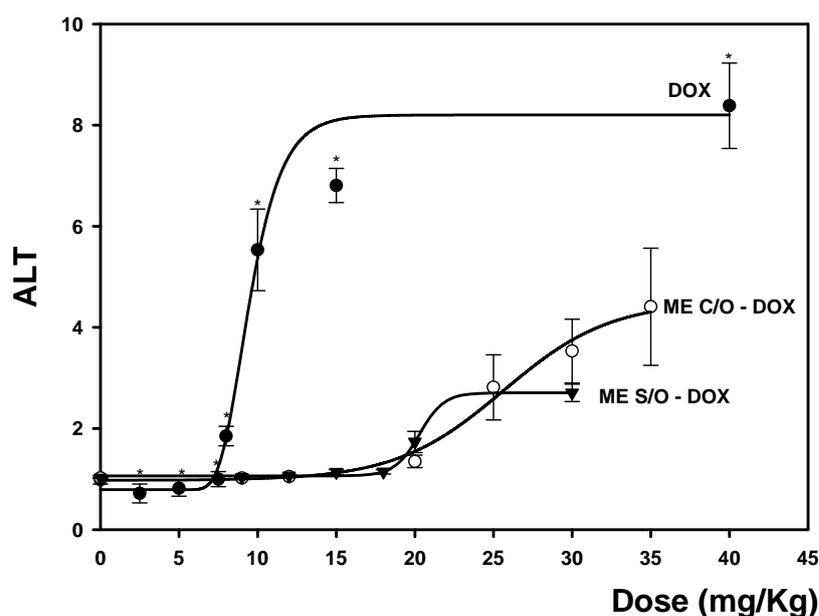
FIGURA 71: Razão pós-tratamento / pré-tratamento da transaminase AST em função da dose administrada.

Esse fato pode ser confirmado pela literatura que mostra que o fígado de ratos tratados com doxorrubicina apresentou necrose dos hepatócitos, atipia e figuras mitóticas em alguns hepatócitos além de uma suave inflamação focal lobular crônica sendo que esse efeito adverso está diretamente relacionado à dose administrada (SAAD *et al.*, 2001). Essa necrose hepática é caracterizada por aumento dos níveis séricos dos biomarcadores ALT e AST (SAAD *et al.*, 2001; ITO *et al.*, 2001).

Por outro lado, o grupo das microemulsões sem e com oleato de sódio veiculando DOX apresentaram uma diminuição significativa da atividade enzimática da transaminase AST em cerca de 4,15 e de 3,16 vezes, respectivamente quando comparado com a DOX na

forma farmacêutica convencional ($p < 0,05$) (Figura 71). Essas mesmas ME apresentaram também uma diminuição significativa da atividade enzimática da transaminase ALT em cerca de 3,74 (ME-S/O) e 2,16 (ME-C/O) vezes, respectivamente quando comparado com DOX na forma farmacêutica convencional ($p < 0,05$). Porém, quando compara-se as ME com e sem oleato de sódio (A_1 e B_1 , Tabelas 2 e 3) veiculando DOX o aumento dessas atividades (AST e ALT) não foram significativos ($p > 0,05$) (Figura 71 e 72), esse fato já era esperado conforme foi explicado no item anterior.

Os resultados obtidos nas Figuras 71 e 72 também mostraram que essas atividades (AST e ALT) não aumentaram significativamente em relação ao grupo controle (microemulsões sem DOX) ($p > 0,05$), uma vez que os componentes utilizados nessas ME contornam problemas de toxicidade (KIBBE, 2000) conforme dito anteriormente (Item 5.2.2.1). Dessa forma, as ME sem DOX contribuem para minimizar o efeito hepatotóxico da DOX.



Dunn's Methods: * $p < 0,05$.

FIGURA 71: Razão pós-tratamento / pré-tratamento da transaminase ALT em função da dose administrada.

Esses resultados são esperados uma vez que essas microemulsões aumentaram a DL_{50} da DOX (Figura 68), aumentando seu índice terapêutico e minimizam os efeitos adversos da DOX como a hepatotoxicidade (Figuras 71e 72). Além disso, a literatura mostra que sistemas nanoestruturados apresentam uma redução da distribuição da DOX nos tecidos-alvos tais

como rim, fígado e coração quando comparada com a DOX na forma farmacêutica convencional minimizando seu efeito adverso (WANG e QUINN, 2002) tal como o hepatotóxico.

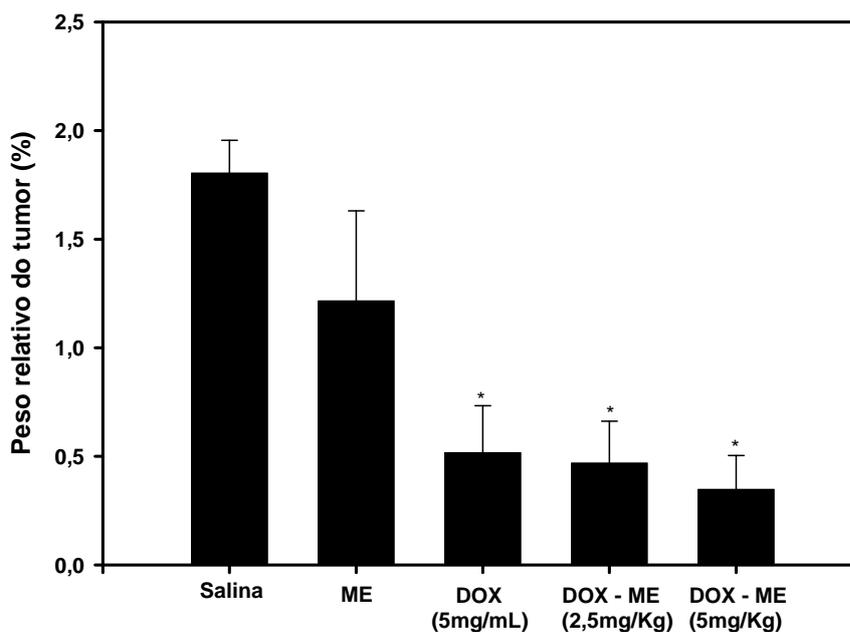
Essa redução da distribuição da DOX pode ser sugerida devido a esses sistemas nanoestruturados, tal como as microemulsões estudadas apresentarem-se como um sistema termodinamicamente estável, capaz de incorporar a DOX nas gotículas da fase interna influenciando fortemente na sua liberação (Figuras 48 e 67), assim como na sua biodisponibilidade sendo capazes de minimizar o efeito hepatotóxico da DOX (Figuras 71 e 72), por sua capacidade de obter uma liberação prolongada (Figuras 48 e 67), diminuir a toxicidade aguda (Figura 69) e aumentar a eficácia terapêutica do antineoplásico (Item 5.2.3), o que permite a redução da dose administrada uma vez que os efeitos adversos potenciais desse fármaco está diretamente relacionado à dose-administrada (SAAD *et al.*, 2001; SACCO *et al.*, 2001; MITRA *et al.*, 2001; ITO *et al.*, 2001) fato confirmado também pelas Figuras 70 e 71.

5.2.3 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTITUMORAL

Sistemas nanoestruturados tais como as ME são carreadores coloidais utilizados como sistemas de liberação prolongada de fármacos e podem agir como um veículo carreador de fármaco capaz de atingir tecidos ou células tumorais, enquanto protege a inativação prematura do princípio ativo durante o seu transporte (PRETE *et al.*, 2006; DIAS *et al.*, 2007).

Assim, como veículo proposto, é esperado aumentar a eficácia da doxorubicina, visto que a ME poderá proporcionar 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 (FORMARIZ *et al.*, 2004). Dessa forma, testes farmacológicos devem ser realizados para garantir a eficácia terapêutica no uso da DOX quando incorporada em ME.

A atividade antitumoral “*in vivo*” das microemulsões com e sem oleato de sódio contendo doxorubicina em tumores ascítico de Erlich estão demonstrados nas Figuras 73 e 74 através do peso relativo do tumor (%) em função das doses administradas (2,5; 5 e 10mg/Kg). O peso relativo do tumor (%) em cada grupo foi o parâmetro escolhido para realizar as comparações entre os grupos. As microemulsões estudadas (Tabelas 2 e 3) foram administradas nos animais logo após o preparo.



Dunn's Methods: * $p < 0,05$.

FIGURA 73: Efeito antitumoral “*in vivo*” da microemulsão com oleato de sódio contendo doxorubicina.

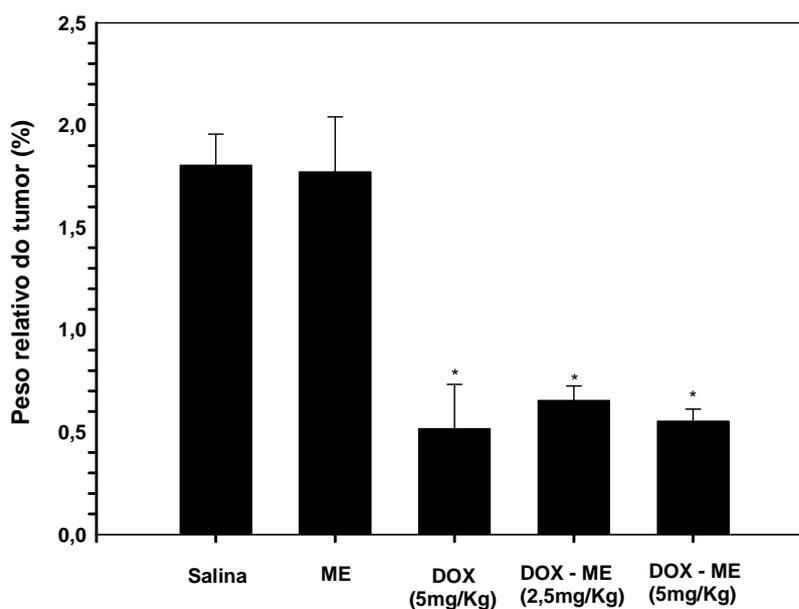
Os resultados (Figuras 73 e 74) referentes ao peso relativo do tumor (%) mostraram que os grupos do cloridrato de doxorubicina apresentaram inibição significativa da atividade tumoral ($p < 0,05$) em relação ao grupo salina uma vez que a DOX reduziu o peso relativo do tumor cerca de 3,48 vezes em relação ao grupo salina. Fato esperado já que a DOX apresenta atividade citotóxica e, portanto foi utilizada com o objetivo de padronizar a resposta biológica da linhagem celular utilizada (TAE) a este fármaco, sendo essa determinação utilizada como controle de qualidade da cultura celular. Pois, foi determinado o perfil de quimiosensibilidade da linhagem celular a DOX, a fim de assegurar a confiabilidade da cultura celular, garantindo que a mesma não sofreu mutações, alterando a linhagem padrão (SACOMAN, 2007).

As análises dos resultados (Figuras 73 e 74) mostraram que as ME sem e com oleato utilizadas como controle e/ou branco do sistema não apresentaram atividade antitumoral significativa ($p > 0,05$) quando comparado com o grupo do Cloridrato de doxorubicina, já que os componentes utilizados contornam problemas de toxicidade (KIBBE, 2000), podendo confirmar que nessas porcentagens de fase oleosa, aquosa e mistura tensoativa (A₁ e B₁, Tabelas 2 e 3) os sistemas estudados não são capazes de inibir o crescimento do TAE demonstrando que esses sistemas não potencializam o efeito antitumoral do fármaco para a linhagem utilizada conforme já foi demonstrado nos ensaios de atividade antitumoral “*in vitro*” (FORMARIZ, 2004).

As microemulsões com e sem oleato de sódio contendo DOX (Figuras 73 e 74) apresentaram uma redução significativa do peso relativo do tumor em cerca de 3,84 e 5,18 vezes (ME-OS – 1,5% CHO) e cerca de 2,17 e de 3,27 vezes (ME sem OS – 3% CHO) para as doses de 2,5 e 5mg/Kg, respectivamente quando comparado com o grupo salina ($p < 0,05$). A atividade antitumoral da dose de 10mg/Kg das ME com e sem oleato de sódio não puderam ser avaliadas uma vez que todos os animais morreram durante os 15 dias de experimento.

Embora, a inibição da atividade tumoral em função da dose administrada de DOX-ME com e sem OS e em relação ao grupo do Cloridrato de DOX não foi significativa ($p > 0,05$); os resultados mostraram que a atividade citotóxica do fármaco quando veiculado em ME foi potencializada (Figuras 73 e 74, 2,5mg/Kg de DOX-ME), apesar das ME liberarem uma quantidade menor de DOX na célula tumoral quando comparado com o fármaco livre uma vez que esses sistemas apresentam-se como sistemas reservatórios da DOX proporcionando uma liberação prolongada “*in vitro*” (Figuras 48 e 67). Esse fato pode ser afirmado, pois com uma dose duas vezes menor a DOX-ME fez o mesmo efeito que o fármaco livre (Figuras 73 e 74), além de reduzir a toxicidade em animais (Figura 69). Assim, os resultados de toxicidade aguda (Figura 69) associados aos resultados de atividade antitumoral (Figuras 73 e 74) mostraram que os sistemas microemulsionados aumentaram o índice terapêutico da DOX e conseqüentemente, sua eficácia terapêutica.

A potencialização do efeito antitumoral da DOX-ME provavelmente deve estar relacionada à alteração do processo de distribuição do fármaco uma vez que esses sistemas (A_1 e B_1 , Tabelas 2 e 3) alteram a permeabilidade celular, facilitando a entrada da DOX na célula tumoral e portanto, favorece sua atividade antitumoral.



Dunn's Methods: * $p < 0,05$.

FIGURA 74: Efeito antitumoral “*in vivo*” da microemulsão sem oleato de sódio contendo doxorubicina.

Assim, os resultados de caracterização física, estabilidade, toxicidade aguda, parâmetros bioquímicos e atividade antitumoral “*in vivo*” obtidos nesse trabalho indicam que a nanoencapsulação continua sendo uma alternativa para a aplicação terapêutica de fármacos com ação antitumoral, tanto para a obtenção de uma melhor eficácia terapêutica quanto para a minimização dos efeitos tóxicos.

VI. CONCLUSÃO

6. CONCLUSÃO:

A análise dos resultados das características físico-químicas, da estabilidade física, da toxicidade aguda, dos parâmetros bioquímicos e da atividade antitumoral “*in vivo*” da doxorubicina incorporadas em microemulsões lipídicas estabilizadas com EU/FS/OS (35:35:30 p/p) e EU/FS (1:1 p/p) possibilitaram as seguintes conclusões:

- As ME comportam-se como fluidos não-newtonianos.
- As ME contendo OS comportam-se como sistemas pseudoplásticos e tixotrópicos, o que facilita a aplicação via parenteral.
- As ME sem OS comportam-se como sistemas plásticos e tixotrópicos, facilitando também a aplicação via parenteral.
- A viscosidade aparente das ME aumenta a medida que a concentração de CHO aumenta e/ou a DOX é incorporada no sistema.
- As medidas de compliância e G' e G'' mostram que as ME contendo OS apresentam comportamento típico de sistemas líquidos viscosos, a qual a componente elástica é desprezível.
- As medidas de compliância e G' e G'' mostram que as ME sem OS e as ME com e sem OS contendo DOX apresentam comportamento típico de sistemas viscosos com uma componente elástica acentuada, apresentando comportamento viscoelástico. Esse fato é favorecido a medida que a concentração de CHO aumenta e a DOX é incorporada no sistema.
- As medidas de microscopia de luz polarizada, SAXS e difração de raio-X indicam a presença de sistemas com fases microemulsionadas, porém quando a concentração de CHO aumenta e/ou quando a DOX é incorporada ao sistema ocorre a formação de CHO lamelar e CHO na forma cristalina visto que a estruturação do sistema é dependente da relação tensoativo/fase oleosa.

- As medidas de microscopia de luz polarizada, SAXS e difração de raio-X também mostraram que o grau de cristalização do colesterol é ainda mais favorecido a medida que se aumenta a concentração de CHO e quando a DOX é incorporada ao sistema.

- Os estudos de estabilidade mostraram que a inclusão do OS a mistura tensoativa (EU/FS) favorece a estabilidade do sistema uma vez que este reduz o parâmetro de empacotamento crítico da FS, por aumentar a hidrofilia da mistura tensoativa, permitindo uma maior flexibilidade do filme interfacial para obter a curvatura necessária para a formação de gotículas na ordem de nanômetros.

- As ME sem OS apresentaram uma dose letal média cerca de 1,8 (ratos) e 2,6 (camundongos) vezes maior do que a forma farmacêutica convencional, no caso o pó liofilizado do cloridrato de doxorrubicina.

- As ME com OS apresentaram uma dose letal média cerca de 2,8 (ratos) e 6 (camundongos) vezes maior do que a forma farmacêutica convencional, no caso o pó liofilizado do cloridrato de doxorrubicina e cerca de 1,56 (ratos) e 1,7 (camundongos) vezes maior do que a ME sem oleato de sódio contendo DOX.

- A DL_{50} obtida em camundongos foi cerca de 1,35, 1,98 e 2,15 (DOX, ME sem OS e ME-OS, respectivamente) vezes maior do que quando comparada em ratos, pois a absorção, a distribuição, a metabolização e a eliminação da DOX e da DOX-ME ocorrem em função da taxa metabólica basal (TMB) do animal e esses animais apresentam TMB diferentes.

- As ME com e sem OS apresentaram uma diminuição da atividade da isoenzima MB da creatinina kinase em cerca de 1,79 e de 1,31 vezes, respectivamente quando comparado com a DOX na forma farmacêutica convencional.

- As ME sem e com OS apresentaram uma diminuição da atividade enzimática das transaminases AST em cerca de 4,15 e de 3,16 vezes, respectivamente quando comparado com a DOX na forma farmacêutica convencional.

- As ME sem e com OS apresentaram uma diminuição da atividade enzimática das transaminases ALT em cerca de 3,74 e de 2,17 vezes, respectivamente quando comparado com a DOX na forma farmacêutica convencional.

- As ME sem e com OS minimizaram a cardiotoxicidade e a hepatotoxicidade da DOX comparado com a DOX na forma farmacêutica convencional.

- As ME com e sem OS apresentaram uma redução significativa do peso relativo do tumor em cerca de 3,84 e 5,18 vezes (ME-OS) e cerca de 2,17 e de 3,27 vezes (ME sem OS) para as doses de 2,5 e 5mg/Kg, respectivamente quando comparado com o grupo salina.

- As ME com e sem OS potencializaram a atividade antitumoral da DOX quando comparado com a DOX na forma farmacêutica convencional.

VII. 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.

ACTIS, G.C., VOPES, R., RIZZETTO, M. Oral microemulsion cyclosporin to reduce steroids rapidly in chronic active ulcerative colitis. *Eur. J. Gastroenterol. Hepatol.*, v.11, p.905-908, 1999.

ADES, A.; CARVALHO, J.P.; GRAZIANI, S.R.; AMÂNCIO, R.F.; SOUEN, J.S.; PINOTTI, J.A.; MARANHAO, R. C. Uptake of a cholesterol-rich emulsion by neoplastic ovarian tissues. *Gynecol. Oncol.*, v.82, p.84-87, 2002.

ALLEN, T.M.; CHONN, A. Large unilamellar liposomes with low uptake into the reticuloendotelial system. *FEBS Lett*, v.223, p.42-46, 1987.

ALTIERI, D.C. The molecular basis and potential role of survival in cancer diagnosis and therapy. *Mol. Med.*, v.7, p.1-6, 2001.

ANDRESEN, T. L.; JENSEN, S. S.; JORGENSEN, K. Advanced strategies in liposomal cancer therapy: Problems and prospects of active and tumor specific drug release. *Prog. Lip. Res.*, v. 44, p.68-97, 2005.

ARAÚJO, J. *Biologia*, 2004. [Online] Disponível em: <http://www.dbio.uervora.pt> Acesso em: 29, Jun., 2005.

ASHIKAWA, K.; SHISHODIA, S.; FOKT, I.; PRIEBE, W.; AGGARWALL, B.B. Evidence that activation of nuclear factor KB is essential for the cytotoxic effects of doxorubicin and its analogues. *Bioch. Pharm.*, v.67, p.353-364, 2004.

ATKINSON, H.V. Modelling the semisolid processing of metallic alloys. *Prog. Mat. Sci.*, v. 50, p.341-412, 2005.

AZEVEDO, C.H.; CARVALHO, J.P.; VALDUGA, C.J.; MARANHÃO, R.C. Plasma kinetics and uptake by the tumor of a cholesterol-rich microemulsion (LDE) associated to etoposide oleate in patients with ovarian carcinoma. *Gynecol. Oncol.*, v.97, p.178-182, 2005.

BAPTISTA, M.Z. Doxorubicina lipossomal peguilada no tratamento do câncer de mama metastático. *Prát. Hosp.*, n.37, p.2012-2037, 2005.

BARRATT G. Therapeutic applications of colloidal drug carriers. *Pharm. Sci. Tech. Today*, v.3, p.163-171, 2000.

BARRAUD, L., MERLE, P., SOMA, E., LEFRANÇOIS, L., GUERRET, S., CHEVALLIER, M., DUBERNET, C., COUVREUR, P., TREPO, C., VITVITSKI, L. Increase of doxorubicin sensitivity by doxorubicin-loading into nanoparticles for hepatocellular carcinoma cells *in vitro* and *in vivo*. *J. Hepatol.*, v.42, p.736-743, 2005.

BARROS, S.B.M.; DAVINO, S. Avaliação da Toxicidade. In: OGA, S. *Fundamentos de Toxicologia*. 2ed. São Paulo: Editora Atheneu, 2003. cap. 1.5, 59-67p.

BATISTA, C.M.; CARVALHO, C.M.B.; MAGALHÃES, N.S.S. Lipossomas e suas aplicações terapêuticas: Estudo da arte. *Rev. Bras. Ciênc. Farm.*, v.43, p.167-198, 2007.

BATRAKOVA, E.V.; DORODNYCH, T.Y.; KLINSKII, E.Y.; KLIUSHNENKOVA, E.N.; SHEMCHUKOVA, O.B.; GONCHAROVA, O.N. Anthracycline antibiotics non-covalently incorporated into the block copolymer micelles: “*In vivo*” evaluation of anti-cancer activity. *Br. J. Cancer*, v.74, p.1545-52, 1996.

BERRY, G.; BILLINGHAM, M.; ALDERMAN, E.; RICHARDSON, P.; TORTI, F.; MARTIN, F.J. The use of cardiac biopsy to demonstrate reduced cardiotoxicity in AIDS Kaposi’s sarcoma patients treated with pegylated liposomal doxorubicin. *Ann. Oncol.*, v.9, p.711-716, 1998.

BEAUCAGE, G.; ULIBARRI, T.A.; BLACK, E.P.; SCHAEFER, D.W. *Multiple size scale structures in silica-siloxane composites studied by small – angle scattering*. Schaefer,

Hybrid Organic Inorganic Composites, Washington: American Chemical Society, 1995, Chapter 9.

BHARGAVA, H.N.; NARURKAR, A.; LIEB, L.M.. Using microemulsions for drug delivery. *Pharm. Technol.*, v.3, p.46-54, 1987.

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

BIOMOL, 2005. Disponível em: <http://www.biomol.net>. Acesso em: 27 de março de 2006.

BORDINI, C.V. *Caracterização, estabilidade e propriedades magnéticas do polímero quitosana ferro*. 2006. 67f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade do Vale do Itajaí, Itajaí, 2006.

BORNÉ, J.; NYLAMDER, T.; KHAN, A. Phase behaviour and aggregate formation for the aqueous monoolein system mixed with sodium oleate and oleic acid. *Lang.*, v.17, p.7742-7751, 2001.

BOUKET, R.J.; OLSON, R.D.; BRENNER, D.E.; OGUNBUNMI, E.M.; INUI, M.; FLISCHER, S. The major metabolite of doxorubicin is a potent inhibition of membrane-associated ion pumps. *J. Biol. Chem.*, v.262, p.15851-15856, 1987.

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

BURTIS, C.A.; ASHWOOD, E.R. *Tietz fundamentals of clinical chemistry*. 5th ed. Philadelphia: W.B. Saunders, 2001, 1091p.

CALTEL, L.; CERUTI, M.; DOSEO, F. From conventional to stealth liposomes: a new frontier in cancer chemotherapy. *Tum.*, v.89, p.237-239, 2003.

CERA, R.F.L. *Estudo da Incorporação do Diclofenaco Sódico com Microemulsão Lipídicas: Formulação e Liberação "in vitro"*. 2001. 145f.. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2001.

CHABNER, A.; CALABRESI, P. Chemoterapy neoplastic diseases. In: GOODMAN& GILMAN'S. *The pharmacological bais of therapeutics*. 10th ed.The McGraw-Hill Companies, Inc., USA, 2001, cap.25, p.1381-1459.

CHANDY, T.; SHARMA, C.P. Effect of liposome-albumin coatings on ferric ion retention and release from chitosan beads. *Biomat.*, v.17, p.61-66, 1996.

CHAKRABARTI, K.B.; HOPEWELL, J.W.; WILDING, D.; PLOWMAN, P.N. Modification of doxorubicin – induced cardiotoxicity: effect of essential fatty acids and ICRF-187 (dexrazone). *Eur. J. Canc.*, v.37, p.1435-1442, 2001.

CHARROIS, G.J.R.; ALLEN, T.M. Drug release rate influences the pharmacolgy cinetics biodistribution, therapeutic activity, and toxicity of pegylated liposomal doxorubicin formulations in murine breast cancer. *Bioch. Bioph. Act.*, v.1663, p.167-177, 2004.

CHEN, C. T.; IDZERDA, Y. U.; LIN, H.J.; SMITH, N.V.; MEIGS, G.; CHABAN, E.; HO, G. H.; PELLEGRIN, E.; SETTE, F. Experimental Confirmation of the X-Ray Magnetic Circular Dichroism Sum Rules for Iron and Cobalt. *Phys. Rev. Lett.*, v.75, p.152-155, 1995.

CHIANNIKULCHAI, N., AMMOURY, N., CAILLOU, B., DEVISSAGUET, J.P., COUVREUR, P. Hepatic tissue distribution of doxorubicin-loaded nanoparticles after IV administration in reticulosarcoma M5076 metastasis-bearing mice. *Canc. Chemother. Pharmacol.*, v.26, p.122-6, 1990.

CHIAVACCI, L.A. *Formação de sóis e géis a partir de soluções aquosas de oxicloreto de zircônio: efeito da modificação por sulfato na termoreversibilidade da transição sol-gel*.

1996.88f. Dissertação (Mestrado em Química) – Instituto de Química de Araraquara, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 1996.

CHOU, H.; WANG, K.; CHEN, C.; WEI, L.; LAI, C.; HSIEH, C.; YANG, Y.; TWU, N.; CHANG, T.; YEN, M. Pegylated liposomal doxorubicin (Lipo-Dox®) for platinum-resistant or refractory epithelial ovarian carcinoma: A Taiwanese gynecologic oncology group study with long-term follow-up. *Gynecol. Oncol.*, v.101, p.423-428, 2006.

CODDE, J.P.; LUMSDEN, A.J.; NAPOLI, S.; BURTON, M.A.; GRAY, B.N. A comparative-study of the anticancer efficacy of doxorubicin carrying microspheres and liposomes using a rat-liver tumor-model. *Anticanc. Res.*, v.13, p.539-43, 1993.

COELHO, J.P. *Avaliação da biocompatibilidade de magnetolipossomas à base de nanopartículas de maghemita*. Brasília, 2008, 85f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina, Universidade de Brasília, Brasília, 2008.

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.

CORREA, M.A. *Incorporação de naproxeno em sistema microemulsionado: liberação in vitro e avaliação biológica*.1996. Dissertação (Doutorado em Ciências Farmacêuticas) – 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. *Coll. Surf. B*, v.43, p.106-112, 2005.

CORTESI, R.; ESPOSITO, E.; MAIETTI, A.; MENEGATTI, E.; NASTRUZZI, C. Formulation study for the antitumor drugs camptothecin: Lipossomes, micellar solution and a microemulsion. *Int. J. Pharm.*, v.159, p.95-103, 1997.

CORTESI, R.; NASTRUZZI, C. Lipossomes, micelles and microemulsion as new delivery systems for citotoxic alkaloids. *Rev.-Res. Foc.*, v.2, p.288-298, 1999.

COUVREUR, P.; KANTE, B.; GRISLAIN, L.; ROLAND, M.; SPEISER, P. Toxicity of polyalkylcyanocrylate nanoparticles. II. Doxorubicin loaded nanoparticles. *J. Pharm. Sci.*, v.71, p.790-793, 1982.

CRUZ, D'J.O.; UCKUN, M.F., Gel-microemulsions as vaginal spermicidal and intravaginal drug delivery vehicles. *Contracep.*, Stoneham, v.64, p.113-123, 2001.

CUNHA-JÚNIOR, A.; FIALHO, S.L.; CARNEIRO, L.B.; ORÉFICE F. Microemulsões como veículo de drogas para administração ocular tópica. *Arq. Bras. Oftal.*, v.63, p.285-391, 2003.

CZARNECKI, A.; HINEK, A.; SOLTYSIAK-PAWLUCZUK, D. Adriamycin – induced cardiomyopathy, a rat model. *Pol. J. Pharmacol. Pharm.*, v.38, p.171-177, 1986.

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.

DEFRANCESCO, T.C.; HAUCK, M.L. What's new in doxorubicin-induced cardiotoxicity. In: AMERICAN COLLEGE OF VETERINARY INTERNAL MEDICINE FORUM, 18., 2000, Seattle, Washington. *Proceed.* p.121-122.

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.

DICKINSON, E. *An introduction to foods Colloids*. Oxford: Oxford Science Publications, 1992, cap.3.

DUNCAN, R. Drug polymer conjugates — potential for improved chemotherapy. *Anti-Cancer Drugs*, v.3, p.175-210, 1992.

EARLY BREAST CANCER TRIALISTS' COLLABORATIVE GROUP. Polychemotherapy for early breast cancer: An overview of the randomised trials. *Lanc.*, v.352, p.930-942, 1998.

EPAND, R. M., BACH, D.; BOROCHOV, N., WACHTEL, E. Cholesterol Crystalline Polymorphism and the Solubility of Cholesterol in Phosphatidylserine. *Biophys. J.*, v.78, p.866-873, 2000.

EPAND, R. M., BACH, D.; EPAND, R.F. ; BOROCHOV, N., WACHTEL, E. A New High-Temperature Transition of Crystalline Cholesterol in Mixtures with Phosphatidylserine. *Biophys. J.*, v.81, p.1511-1520, 2001.

EZRAHI, S.; ASERIN, A.; GARTI, N. Aggregation behavior in one-phase (Winsor IV) microemulsion systems. In: KUMAR, P.; MITTAL, K.L., ed. *Handbook of Microemulsion Science and Technology*. New York: Marcel Dekker, 1999. cap.7, p.195-240.

FA, N.; BABAH, V.G.; STÉBÉ, M. The release of caffeine from hydrogenated and fluorinated gel emulsions and cubic phases. *Coll. Surf. A: Physicochem. Eng. Aspects*, v.243, p.117-125, 2004.

FAMAP- NUTRIÇÃO PARENTERAL. Emulsões lipídicas TCM/TCL, 2008. [Online] Disponível em: <http://www.famap.com.br/lipides.asp> Acesso em: 10, Jan., 2008.

FARKAS, E.; ZELKÓ, R.; NÉMETH, Zs.; PÁLINKÁS, J.; MARTON S.; RÁCZ, I. The effect of liquid crystalline structure on chlorhexidine diacetate release. *Int. J. Pharm.*, v.193, p.239-245, 2001.

FERRAZ, E.R.; ALVES, M.C.M. Marcadores bioquímicos de injúria cardíaca, 2002. [Online] Disponível em: http://www.crfmg.org.br/GEAC/ARTIGOS/artigos_marcbioq2.htm Acesso em: 27, Out., 2006.

FIALHO, S.L.; CUNHA-JÚNIOR, A.S. Sistemas de transportadores de drogas para o seguimento posterior do olho: bases fundamentais e aplicações. *Arq. Bras. Oftalmol.*, v.70, p.173-179, 2007.

FLORENCE A.T., ATTWOOD D. Solubility and partitining of drugs. In_. *Physicochemical principles of pharmacy*. 2nd ed. London: Macmillan Press, 1998. cap.5, p.132-171.

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

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. *Infar.*, v.16, p.44-57, 2004.

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, p.301-313, 2005.

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. *Coll. Surf. B-Biointerf.*, v.51, p.54-61, 2006.

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

FORMARIZ, T.P.; CHIAVACCI, L.A.; SARMENTO, V.H.S.; FRANZINI, C.M.; SILVA-JÚNIOR, 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 phosphatidylcholine and its relationship with doxorubicin release. *Coll. Surf. B-Biointerf.*, v.63, p.287-295, 2008.

FRANZINI, C.M. *Estudo de microemulsões e subemulsões contendo anfotericina B para administração oral*. 2006. 119f. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2006.

FROKJAER, S.; HJORTH, E.L.; WORTS, O. Stability testing of liposomes during storage. In: GREGORIADIS, G. *Liposome Technology*. Boca Raton: CRC, 1989. v.1, p.241-243.

GABBOUN, N.H.; NAJIB, N.M.; IBRAHIM, H.G.; ASSAF, S. Release of salicylic acid and diclofenac acid salts from isotropic and anisotropic nonionic surfactant systems across rat skin. *Int. J. Pharm.*, Amsterdam, v.212, p.73-80, 2001.

GABIZON, A.A. Liposomal anthracyclines. *Hematol. Oncol. Clin. North Am.*, v.8, p.431-450, 1994.

GABIZON, A.; MARTIN F. Polyethylene glycol-coated (pegylated) liposomal doxorubicin. Rationale for use in solid tumors. *Drug.*, v.54, p.15-21, 1997.

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

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, p.944-950, 1996.

GILL, P.S.; ESPINA, B.M.; MUGGIA, F.; CABRIALES, S.; TULPULE, A.; ESPLIN, J.A.; LIEBMAN, H.A.; FORSSSEN, E.; ROSS, M.E.; LEVINE, A.M. Phase I/II clinical and pharmacokinetic evaluation of liposomal doxorubicin. *J. Clin. Oncol.*, v.14, p.2353-2364, 1996.

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

GOODWIN, S.C.; BETTNER, C.A.; PETERSON, C.L.; WONG, G. Single-dose toxicity study of hepatic intra arterial infusion of doxorubicin coupled to a novel magnetically targeted drug carrier. *Toxicol. Sci.*, v.60, p.177-183, 2001.

GRAESSLEY, W.W. In: EISEMBERG, E.; GRAESSEY, W.W.; MANDELKEN, L.; KOENING, J.L. *Phys. Proper. Polym.*, American Chemical Society, 1984, cap.3.

GRAZIANI, S.R.; IGREJA, F.A.F.; HEGG, R.; MENEGHETTI, C.; BRANDIZZI, L.I.; BARBOZA, R.; AMÂNCIO, R.F.; PINOTTI, J.A.; MARANHÃO, R.C. Uptake of a cholesterol-rich emulsion by breast cancer. *Gynecol. Oncol.*, v.85, p.493-497, 2002.

GUSTAFSSON, J.; LJUSBERG-WAHREN, H.; ALMGREN, M.; LARSSON, K. Submicron particles of reversed lipid phases in water stabilized by nonionic amphiphilic polymer. *Lang.*, v.13, p.6964-6971, 1997.

HALBERT, G.W.; STUART, J.F.B.; FLORENCE, A.T. The incorporation of lipide-soluble antineoplastic agents into microemulsions-protein-free analogues of low-density lipoprotein. *Int. J. Pharm.*, v.21, p.219-232, 1984.

HANKS, R.W. Axial laminar-flow of yield-pseudoplastic fluids in a concentric annulus. *Indus. Eng. Chem. Proc. Des. Dev.*, v.18, p.488-493, 1974.

HASKELL, R.J. Characterization of submicron system via optical methods. *J. Pharm. Sci.*, v.87, p.125-129, 1998.

HERAI, H. *Obtenção e caracterização de formulações contendo doxorubicina para a quimioterapia tópica do câncer de pele: iontoforese versus promotor de absorção* 2004. 165 f. Dissertação (Mestrado em Fármaco e Medicamentos). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Ribeirão Preto, 2004.

HOAR, T.P., SCHULMAN J.H. Transparent water-in-oil dispersions: the oleopathic hydromicelle. *Nat.*, v.152, p.102-105, 1943.

HOU, G.; DICK, R.; ABRAMS, G.D.; BREWER, G.J. Tetrathiomolybdate protects against cardiac damage by doxorubicin in mice. *J. Lab. Clin. Med.*, v.146, p.299-303, 2005.

HUNGRIA, V.T.M.; LATRILHA, M.C.M.; RODRIGUES, D.G.; BYDLOWSKI, S.P.; CHIATTONE, C.S.; MARANHAO, R.C. Metabolism of a cholesterol-rich microemulsion (LDE) in patients with multiple myeloma and a preliminary clinical study of LDE as a drug vehicle for the treatment of the disease. *Canc. Chem. Pharmacol.*, v.53, p.51-60, 2004.

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.

IBRAHIM, H.G.; SALLAM, E.; TAKIEDDIN, M.; HABBOUB, M. Effects of solutes characteristics and concentration on a lyotropic liquid crystal: solute-induced phase change. *Pharm. Res.*, Arlington, v.10, p.737-742, 1993.

IKE, O.; SHIMIZU, Y.; IKADA, Y.; WATANABE, S.; NATSUME, T.; WADA, R. Biodegradation and antitumour effect of adriamycin-containing poly(L-lactic acid) microspheres. *Biomat.*, v.12, p.757-62, 1991.

ISRAELACHVILIE, J.N.; MITCHELL, D.J.; NINHAM, B.W.J. *Chem. Soc. Far. Trans.*, v.72, p.1525, 1976.

ITO, K.; OZASA, H.; NAGASHIMA, Y.; HAGIWARA, K.; HORIKAWA, S. Pharmacological preconditioning with doxorubicin: Implications of heme oxygenase-1 induction in doxorubicin – induced hepatic injury in rats. *Bioch. Pharmacol.*, v.62, p.1249-1255, 2001.

KAYSER, O.; OLBRICH, C.; YARLEY, V.; KIDERLEN, A.F.; CROFT, S.L. Formulation of amphotericin B as nanosuspension for oral administration. *Int. J. Pharm.*, v.254, p.73-75, 2003.

KEGEL, W.K.; OVERBEEK, J.T.G.; LEKKERKERKER, H.N.W. Thermodynamics of microemulsions I. In: KUMAR, P.; MITTAL, K.L. (Eds). *Handbook of microemulsion science and technology*. Dekker, Basel, New York, 1999, p.13-44.

KIBBBE, A.H. (Ed.) *Handbook of pharmaceutical excipients*, 3rd ed. Publicado por The American Pharmaceutical Association, London, United Kingdom, 2000, 665p.

KISSEL, T., LI, Y.X., VOLLAND, C., GORICH, S., KONEBERG, R. Parenteral protein delivery systems using biodegradable polyesters of ABA block structure, containing hydrophobic poly(lactide-co-glycolide) A blocks and hydrophilic poly(ethylene oxide) B blocks. *J. Control. Rel.*, v.39, p.315-26, 1996.

KORHONEN, M. *Rheological properties of pharmaceutical creams containing sorbitan fatty acid ester surfactants*. 2004. 58fls. Academic Dissertation – Department of Pharmacy, University of Helsinki, Finland, 2004.

KORHONEN, M.; HIRVONEN, J.; PELTONEN, L.; ANTIKAINEN, O.; YRJANAINEN, L.; YLIRUUSI, J. Formation and characterization of three-component-sorbitan monoester surfactant, oil and water-creams. *Int. J. Pharm.*, v.269, p.227-239, 2004.

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

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

LARINI, L. *Toxicologia*. 3ed. São Paulo: Editora Manole, 1997. cap.2, 43-45p.

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

LEAKAKOS, T.; JI, C.; LAWSON, G.; PETERSON, C.; GOODWIN, S. Intravesical administration of doxorubicin to swine bladder using magnetically target carriers. *Canc. Chem. Pharmacol.*, v.51, p.445-450, 2003.

LECOMTE, A. *Application de la diffusion des rayons-X a l' etude de separations phases amorphes et aux procedes sol-gel*. 1988. Tese (Doutorado) L' Université de Limoges, 1988.

LEE, M.J.; LEE, M.H.; SHIN, C.K. Inverse targeting of drugs to reticuloendothelial system-rich organs by lipid microemulsion emulsified with poloxamer 338. *Int. J. Pharm.*, v.113, p.175-187, 1995

LEFRAK, E.A.; PITHA, J.; ROSENHEIM, S., GOTTLEIB, T. A clinicopathologic analysis of adrimycin cardiotoxicity. *Canc.*, v.32, p.302-314, 1973.

LEHNINGER, A.L. *Princípios de bioquímica*. 2ª ed. São Paulo: Sarvier, 2000.839p.

LITCHFIELD – Jr, J.T.; WILCOXON, F. A simplifield method of evaluating dose-effect experiments. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, v.96, p.99-113, 1949.

LIU, F.; LIU, D. Long circulating emulsions (oil-in-water) as carriers for lipophilic drugs. *Pharm. Res.*, v.12, p.1060-4, 1995.

LOOMIS, T.A. *Fundamentos de toxicologia*. Zaragoza, Espanha:Acribia, 1974. 35p.

LOOMIS, C.R.; SHIPLEY, G.G.; SMALL, D.M. The phase behavior of hydrated cholesterol. *J. Lip. Res.*, v.20, p.525–535, 1979.

LORENZO, E.; RUIZ, C.R.; QUESADA, A.J.; HERNANDEZ, A.; RIVAS, A.L.; REDONDO, J.M. Doxorubicin induces apoptosis and CD95 gene expression in human primary endothelial cell through a p53 dependent mechanisms. *J. Biol. Chem.*, v.277, p.10883-10892, 2002.

LUKYANOV, A. N.; ELBAYOUMI, T. A.; CHAKILAM, A. R.; TORCHILIN, V.P. Tumor-targeted liposomes: doxorubicin-loaded long-circulating liposomes modified with anti-cancer antibody. *J. Control. Rel.*, v.100, p.135-144, 2004.

LUNDBERG, B.B.; MORTIMER, B.C.; REDGRAVE, T.G. Submicron lipid emulsions containing amphipathic polyethylene glycol for use as drug-carriers with prolonged circulation time. *Int. J. Pharm.*, v.134, p.119-127, 1996.

LYASS, O.; UZIELY, B.; BEN-YOSEF, R.; IZEMACH, D.; HESHING, N.I.; LOTEM, M.; BRUFMAN, G.; GABIZON, A. Correlation of toxicity with pharmacokinetics of pegylated liposomal doxorubicin (Doxil) in metastatic breast carcinoma. *Canc.*, v.89, p.1037-1047, 2000.

LYKLEMA, J. *Fundamentals of interface and colloid science*. London: Academic Press, 1991. v.1:fundamentals.

MALLERY, S.R., PEI, P., KANG, J.; NESS, G.M.; ORTIZ, R.; TOUHALISKY, J.E.; SCHWENDEMAN, S.P. Controlled-release of doxorubicin from poly(lactide-co-glycolide) microspheres significantly enhances cytotoxicity against cultured AIDS-related Kaposi's sarcoma cells. *Anticanc. Res.*, v.20, p.2817-2825, 2000.

MAMOT, C.; DRUMMOND, D. C.; HONG, K.; KIRPOTIN, D.B.; PARK, J. W. Liposome-based approaches to overcome anticancer drug resistance. *Drug Res. Upd.*, v.6, p. 271-279, 2003.

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.; TERYAC, A.M; REDGRAVE, T.G. Effects of cholesterol content on metabolism of protein-free emulsions models of lipoprotein. *Biochem. Biophys. Acta*, v.875, p.247-255, 1986.

MARANHÃO, R.C.; GARICOCHEA, B.; SILVA, E.L.; LLACER, P.D.; PILEGGI, F.J.C.; CHAMONE, D.A.F. Increased plasma removal of microemulsions resembling the lipid phase of low-density lipoproteins (LDL) in patients with acute myeloid leukemia: a possible new strategy for treatment of the disease. *Braz. J. Med. Biol. Res.*, v.25, p.1033-1037, 1992.

MARANHÃO, R.C.; CESAR, T.B.; PEDROSO-MARIANI, S.R.; HIRATA, M.H.; MESQUITA, C.H. Metabolic behaviour in rats of a nonprotein microemulsion resembling low density lipoprotein. *Lip.*, v.28, p.691-696, 1993.

MARANHÃO, R.C.; GARICOCHEA, B.; SILVA, E.L.; LLACERDORLHIAC, P.; CADENA, S.M.S.; COELHO, I.J.C.; MENEGHETTI, J.C.; PILEGGI, F.J.C.; CHAMONE, D.A.F. Plasma Kinetics and Biodistribution of a Lipid Emulsion Resembling Low-Density Lipoprotein in Patients with Acute Leukemia. *Canc. Res.*, v.54, p.4660-4666, 1994.

MARANHÃO, R.C. Complexo LDE-quimioterápico, 2001. [Online] Disponível em: <http://www.inova.unicamp.br/inventabrasil/maranhão.htm> Acesso em: 10, Jan., 2008.

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. *Canc. Chemoter. Pharmacol.*, v.49, p.487-498, 2002.

MARRIOTT, C. Rheology and flow of fluids. In: AULTON, M.E. *Pharmaceutics: the science of dosage form design*. Churchill Livingstone, New York, 1988, p.17-37.

MARTIN, A.N.; SWARBRICK, J.; CAMARATA, A. *Physical Pharmacy*, ed. by Lea and Friberg, 2nd edition, Filadelfia, 1969, cap.17.

MATHIASSEN, I.S.; JAATTELA, M. Triggering caspase-independent cell death to combat câncer. *Mol. Med.*, v.8, p.1-9, 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.

MELO, L.C.A. *Tópicos da Medicina Laboratorial: marcadores bioquímicos de injúria cardíaca*. Lab Lâmina: 2001.

MERTA, J.; TORKKELI, M.; IKONEN, T.; SERIMAA, R.; STENIUS, P. Structure of cationic starch (CS)/anionic surfactant complexes studied by small-angle x-ray scattering (SAXS). *Macromol.*, v. 34, n.9, p.2937-2946, 2001.

MIGLIETTA, A.; CAVALLI, R.; BOCCA, C.; GABRIEL, L.; GASCO, M.R. Cellular uptake and cytotoxicity of solid lipid nanospheres (SLN) incorporating doxorubicin or paclitaxel. *Int. J. Pharm.*, v.210, p.61-67, 2000.

MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2007. [Online] Disponível em: <http://www.min-saude.pt/noticias/index.asp> Acesso em 17, Ago., 2007.

MITCHELL, D.J.; NINHAM, B.W. Micelles, vesicles and microemulsions. *J. Chem. Soc.*, v.2, p.601-629, 1981.

MITRA, S.; GAUR, U.; GHOSH, P.C.; MAITRA, N.A. Tumor targeted delivery of encapsulated dextran-doxorubicin conjugate using chitosan nanoparticles as carrier. *J. Control. Rel.*, v.74, p.317-323, 2001.

MO, C.; ZHONG, M.; ZHONG, Q. Investigation of structure and structural transition in microemulsion systems of sodium dodecyl sulfonate + *n*-heptane + *n*-butanol + water by cyclic voltammetric and electrical conductivity measurements. *Elect. Chem.*, v.493, p.100-107, 2000.

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. Canc. Inst.*, v.83, p.757-766, 1991.

MOTTA, V.T. *Bioquímica clínica para o laboratório: princípios e interpretações*. 4ª ed. Porto Alegre: Editora Médica Missau; São Paulo: Robe Editorial, 2003. 419p.

MULLER-GOYMANN, C.C.; FRANK, S.G. Interaction of lidocaine and lidocaine HCl with the liquid crystal structure of topical preparation. *Int. J. Pharm.*, Amsterdam, v.29, p.147-159, 1986.

MURRAY, R.K.; GRANNER, D.K.; MAYES, P.A.; RODWELL, V.W. *Haper: bioquímica*. 7ª ed. São Paulo: Atheneu Editora São Paulo, 1994.763p.

MYKHAYLYK, O.; DUDCHENKO, N.; DUDCHENKO, A. Doxorubicin magnetic conjugate targeting upon intravenous injection mice: High gradient magnetic field inhibits the clearance of nanoparticles from the blood. *J. Magnet. Magnet. Mat.*, v.239, p.473-482, 2005.

NEW, R.R.C. Preparations of liposomes. In: NEW, R.R.C. *Liposomes: a practical approach*. Oxford: IRL Press, 1990b, p.33-104.

NIELSEN, J.A. In: BARUCHEL, J.; HODEAN, J.L.; LECHMAN, M.S.; REGNARD, J.R.; SCHLENKER, C. *Diffraction, refraction and absorption of X-rays and neutrons: a comparative exposition*. Paris: Springer Verlag, 1993, p.3-21.

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.*, Copenhagen, 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. Canceriol.*, v.50, p.321-325, 2004.

OCKNER, R. Doenças do fígado, da vesícula biliar e dos ductos biliares. In: WYNGAARDEN, J.B. *Tratado de Medicina Interna*. 19^oed., v.1. Rio de Janeiro:Editora Guanabara Koogan, 1993, 1214p.

OLIVEIRA, A.G. *Efeitos cinéticos e mecanismos de micelas e microemulsões nas reações de decomposição de β -aminofenil penicilinas e cefalosporinas*. 1997. 160f. Tese (livre – docência) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 1997.

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

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. Nov.*, v.27, p.131-138, 2004.

PACHALY, J.R.; BRITO, H.F.V. Interspecific allometric scaling. In: FOWLER, M.E.; CUBAS, Z.S. *Biology, medicine, and surgery of south american wild animals*. 1ed. United States of America: Iowa State University Press, 2001. Cap.40, 475-481p.

POIRIER, V.J.; THAMM, D.H.; KURZMAN, I.D.; JEGNUM, K.A.; CHUN, R.; OBRADOVICH, J.E.; O'BRIEN, M.; FRED, R.M.; PHILLIPS, B.S.; VAIL, D.M. Liposome-encapsulated doxorubicin (Doxil[®]) e doxorubicin in treatment of vaccine-associated sarcoma in cats. *J. Amer. Vet. Med. Assoc.*, v.16, p.726-731, 2002.

PRENTICE, J.H. *Measurements in the rheology of foodstuffs*. Elsevier Applied Science Publishers, London. 1984, 191p.

PRETE, A.C.L.; MARIA, D.A.; RODRIGUES, D.G.; VALDUGA, C.J.; IBANEZ, O.C.; MARANHÃO, R.C. Evaluation in melanoma-bearing mice of an etoposide derivative associated to a cholesterol-rich nanoemulsion. *J. Pharm. Pharmacol.*, v.58, p.801-808, 2006.

PUISIEUX, F.; ROBLOT-TREUPEL, L. Vetorização de vetores de fármacos. *Cad. Farm.*, v.4, p.29-50, 1988.

RIBEIRO, J.N.; OLIVEIRA, T.T.; NAGEM, T.J.; JÚNIOR- FERREIRA, D.B.; PINTO, A.S. Avaliação dos parâmetros sanguíneos de hepatotoxicidade em coelhos normais submetidos a tratamento com antocianina e antocianina + naringenina. *RBAC*, v.38, p.23-27, 2006.

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. Pharm. Pharmacol.*, v.54, p.765-772, 2002.

ROGERSON, A.; CUMMINGS, J.; WILLMOTT N.; FLORENCE, A.T. The distribution of doxorubicin in mice following administration in niosomes. *J. Pharm. Pharmacol.*, v.40, p.337-42, 1988.

RUDGE, S.R.; KURTZ, T.L.; VESSELEY, C.R.; CATTERAL, L.G. Preparation, characterization, and performance of magnetic iron-carbon composite microparticles for chemotherapy. *Biomat.*, v.21, p.1411-1420, 2000.

SAAD, S.Y.; NAJJAR, T.A.; AMMAR, C.; AL-RIKABI, A.L. The preventive role of deferoxamine against acute doxorubicin-induced cardiac, renal and hepatic toxicity in rats. *Pharmacol. Res.*, v.43, p.211 – 218, 2001.

SACCO, G.; BIGIONI, M.; EVANGELISTA, S.; GOSO, C.; MANZINI, S.; MAGGI, C.A. Cardioprotective effects of zofenopril, a new angiotensin-converting enzyme inhibitor, on doxorubicin-induced cardiotoxicity in the rat. *Eur. J. Pharmacol.*, v.414, p.71-78, 2001.

SACOMAN, J.L. *Atividade Antiproliferativa e Mecanismo de Morte Celular dos Extratos Brutos e Frações Ativas de Anacardium humile St. Hil. (Anacardiaceae) e Potomorphe umbellata (L.) Miquel (Piperaceae)*. Campinas, 2005, 110f. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) - Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2007.

SADZUKA, Y.; YAMASHITA, Y.; SUGIYAMA, T.; SONOBE, T. Effect of dihydrokainate on the antitumor activity of doxorubicin. *Canc. Lett.*, v.179, p.157-163, 2002.

SADZUKA, Y.; SUGIYAMA, I.; TSURUDA, T.; SONOBE, T. Characterization of cytotoxicity of mixed polyethyleneglycol modified liposomes containing doxorubicin. *Int. J. Pharm.*, v.312, p.83-89, 2006.

SAFRA, T.; MUGGIA, F.; JEFFERS, S.; TSAO-WER, D.D.; GROSHEN, S.; HENDERSON, R.; BERRY, G.; GABIZON, A. Pegylated liposomal doxorubicin (doxil): reduced clinical cardiotoxicity in patients reaching or exceeding cumulative doses of 500 mg/m². *Ann. Oncol.*, v.11, p.1029-1033, 2000.

SANTOS, J.M.; BRAÚLIO, L.F.; SIMÕES, M.J.; MOURA, O.A.; FERREIRA, C.; FILHO-MARTINEZ, E.E.; BOCANEGRA, J.A. Efeito do enalaprilato na cardiotoxicidade Induzida pela doxorubicina. *Arq. Bras. Cardiol.*, v. 67, p.237-241, 1996.

SANTOS, H.M.L.R. Antineoplásicos encapsulados em lipossomas convencionais e sítio-específico (lectina-conjugada) como sistemas de liberação controlada de fármacos, 2005. [Online] Disponível em: <http://www.fapepi.pi.gov.br/novafapepi/sapiencia14/resumos.php#2> Acesso em: 10, Jan., 2008.

SANTOS, C.A. Magnetismo, farmacologia e medicina, 2007. [Online] Disponível em: <http://images.google.com.br/imgres?imgurl=http://cienciahoje.uol.com.br/images/ch%2520online/colunas/fabrica/106546a.jpg&imgrefurl=http://cienciahoje.uol.com.br/106546&h=189&w=269&sz=15&hl=ptR&start=5&um=1&tbnid=2D6k9In4KEXcdM:&tbnh=79&tbnw=113&prev=/images%3Fq%3Dlipossomas%2B%26um%3D1%26hl%3Dpt-BR> Acesso em: 10, Jan., 2008.

SAPRA, P.; ALLEN, T. M. Ligand-targeted liposomal anticancer drugs. *Prog. Lip. Res.*, v. 42, p. 439- 462, 2003.

SCHAEFER, D.W.; KAEFER, K.D. Structure of random porous materials:silica aerogel. *Phys. Rev. Lett.*, v.56, p.2199, 1986.

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

SCHERING-SCHERING-PLOUGH, 2004. [Online] Disponível em: http://www.drugs.com/PDR/Doxil_Injection.htm Acesso em: 27, Out., 2007.

SCHOLES, P.D., COOMBES, A.G.A., ILLUM, L., DAVIS, S.S., VERT, M., DAVIES, M.C. The preparation of sub-200 nm poly(lactide-co-glycolide) microspheres for site-specific drug delivery. *J. Control. Rel.*, v.25, p.145-53, 1993.

SCOTT, H. Reology. In: Remington (Ed). *The science and practice of pharmacy*. 20nd ed. Philadelphia: Editora Lippincott, 2000, cap.23, p.335-355.

SEARS, F.W.; ZEMANSKY, M.W. *Física*, Livro técnico, Rio de Janeiro, 1971, 300p.

SHAW, D.J. *Introdução à química dos colóides e de superfícies*. Edgard Blucher/EDUSP, São Paulo, 1975, cap.9.

SHINODA, K.; ARAKI, M.; SADAGHIANI, A.; KHAN, A.; LINDMAN, B. Lecithin-based microemulsions: Phase behavior and microstructure. *J. Phys. Chem.*, v.95, p.989-993, 1991.

SILVA, E.J. *Desenvolvimento de microcápsulas de copolímero de ácido poli-lático-co-glicólico, para obtenção de pellets de liberação intravitreal*. 2004. 80f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara, Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Araraquara, 2004.

SILVA, C.E.V.; CAMACHO, A.A. Alterações ecocardiográficas em cães sob tratamento prolongado com doxorubicina. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, v.57, p.300-306, 2005.

SILVA, A.K.A.; SILVA, E.L.; VERISSIMO, L.; CARVALHO, J.F.; SANTOS, K.N.S.; BOLARD, J.; EGITO, E.S.T.; CARRICO, A.S. *The influence of ionic strength on the adsorption of doxorubicin onto magnetic particles*. World Congresso of Pharmacy and Pharmaceutical Science 2006, p.172.

SILVA, A.K.A.; SILVA, E.L.; CARRICO, A.S.; EGITO, E.S.T.; LALATONNE, Y.; MOTTE, L. *Development of magnetic drug carriers for anthracyclines*. World Congresso of Pharmacy and Pharmaceutical Science 2007, p.172.

SOKAL, R.R.; ROHLF, F.J. *Biometry - the principles and practice of statistics*. 2ed. New York: W.H. Freeman, 1981. 859 p.

SON, Y.J.; JANG, J.S.; CO, Y.W.; CHUNG, H.; PARK, R.W.; KWON, I.C.; KIM, I.S.; PARK, J.Y.; SEO, S.B.; PARK, C.R.; JEONG, S.Y. Biodistribution and anti-tumor efficacy of doxorubicin loaded glycol-chitosan nanoaggregates by EPR effect. *J. Control. Rel.*, v.91, p.135-145, 2003.

SONG, C.X., LABHASETWAR, V., MURPHY, H., QU, X., HUMPHREY, W.R., SHEBUSKI, R.J. Formulation and characterization of biodegradable nanoparticles for intravascular local drug delivery. *J. Control. Rel.*, v.43, p.197-212, 1997.

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.

STIDDER, B.; FRAGNETO, G.; ROSER, S.J. Effect of low amounts of cholesterol on the swelling behavior of floating bilayers. *Lang.*, v.21, p.9187 – 9193, 2005.

STRYER, L. *Bioquímica*. 4º ed. Rio de Janeiro:Guanabara Koogan, 1996. 100p.

SWAIN, S.M.; WHALEY, F.S.; EWER, M.S. Congestive heart failure in patients treated with doxorubicin: a retrospective analysis of three trials. *Canc.*, v.97, p.2869-2879, 2003.

SYMON, Z.; PEYSER, A.; TZEMACH, D.; LYASS, O.; SUCHER, E.; SHIZIN, O.; GABIZON, A. Selective delivery of doxorubicin to patients with breast carcinoma metastases by stealth liposomes. *Canc.*, v.86, p.72-78, 1999.

SZASZ, G.; GRUBER, W.; BERNT, E. Creatine kinase in serum: 1. Determination of optimum reaction conditions. *Clin. Chem.*, v.22, p.650-656, 1976.

TAVEIRA, S.F. *Desenvolvimento de formulações iontoforéticas para o tratamento tópico de tumores cutâneos: estudos “in vitro” em cultura de células tumorais*. 2007. 117f. Dissertação

(Mestrado em Fármaco e Medicamentos). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Ribeirão Preto, 2007.

TENJARLA, S. Microemulsions: an overview and pharmaceutical applications. *Crit. Rev. Ther. Drug Carr. Syst.*, v.16, p.461-521, 1999.

THAMM, D.H.; MACEWEN, E.G.; CHUN, R. Phase I clinical trial of Doxil[®], a stealth liposome encapsulated doxorubicin, in cats with malignant tumor. VETERINARY CANCER SOCIETY – AMERICAN COLLEGE OF VETERINARY RADIOLOGY COMBINED CONFERENCE, 1997, *Proc.*, p.38.

TIROSH, O.; KOHEN, R.; KATZHENDLER, J.; ALON, A; BARENHOLZ, Y. Oxidative stress effect on the integrity of lipid bilayers is modulated by Colesterol level of bilayers. *Chem. Phys. Lip.*, 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*. Araraquara, 1996, 95f.. Dissertação (Mestrado) – Instituto de Química Campus de Araraquara, Universidade estadual Paulista, Araraquara, 1996.

TRADOS, T.H.F. *Solids/liquids Dispersions*. Academic Press, London, 1987, cap. 10.

TROTTA, M., CAVALLI, R., UGAZIO, E., GASCO, M.R. Phase behavior of microemulsion systems containing lecithin and lysolecithin as surfactants. *Int. J. Pharm.*, v.143, p.67-73, 1996.

TROTTA, M.; PATTARINO, F.; IGNONI, T. Stability of drug-carrier emulsions containing phosphatidylCOline mixtures. *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, v.53, p.2063-208, 2002.

UCHEGBU, I.F.; DOUBLE, J.A.; TURTON, J.A.; FLORENCE, A.T. Distribution, metabolism and tumoricidal activity of doxorubicin administered in sorbitan monostearate (Span 60) niosomes in the mouse, *Pharm. Res.*, v.12, p.1019-24, 1995.

UCHEGBU, I.F. The biodistribution of novel 200nm palmitoyl muramic acid vesicles. *Int. J. Pharm.*, v.162, p.19-27, 1998.

UCHEGBU, I.F.; DUNCAN, R. Niosomes containing N-(2-hydroxypropyl)methacrylamide copolymer-doxorubicin (PK1): effect of method of preparation and choice of surfactant on niosome characteristics and a preliminary study of body distribution. *Int. J. Pharm.*, v.155, p.7-17, 1998.

URBAN, M.C.C. *Desenvolvimento de sistemas de liberação micro e nanoestruturados para administração cutânea do acetato de dexametasona*. Araraquara, 2004. 137f. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista.

VALDULGA, C.J.; FERNANDES, D.C.; PRETE, A.C.L.; AZEVEDO, C.H.M.; RODRIGUES, D.G.; MARANHÃO, R.C. Use of cholesterol-rich microemulsion that binds to low-density lipoprotein receptors as vehicle for etoposide. *J. Pharm. Pharmacol.*, v.55, p.1615-1622, 2003.

VANDAMME, T.F. Microemulsions as ocular drug delivery systems: recent developments and future challenges. *Prog. Retin. Eye Res.*, v.21, p.15-34, 2002.

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

VON-HOFF, D.D., LAYARD, M.W.; BASA, P.; DAVIS-JÚNIOR, A.L.; VON-HOFF, A.L.; ROZENCWEIG, M.; MUGGIA, F.M. Risk factors for doxorubicin-induced congestive heart failure. *Ann. Inter. Med.*, v. 91, p.710-717, 1979.

XU, J.; KORLLING, K. W. Temperature dependence of rheological behavior of a metallic automotive waterborne basecoat, *Prog. Org. Coat.*, v.53, p.169-176, 2005.

WANG, X.; QUINN, P.J. Cubic phase is induced by cholesterol in the dispersion of 1-palmitoyl – 2- oleoyl-phosphatidylethanolamine. *Bioch. Bioph. Act.*, v.1564, p.66-72, 2002.

WANG, S.; KONOREV, E.A.; KOTAMRAJU, S.; JOSEPHEN, J.; KALIVENDI, S.; KALYANARAMAN, B. Doxorubicin induced apoptosis in normal mechanisms: intermediacy H2O and p53-dependent pathways. *Am. Soc. Bioch. Mol. Biol.*, v.1, p.1-37, 2004.

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.

WIDDER, K.J.; SENYEI, A.E.; SCARPELLI, D.G. Magnetic microspheres: a model system for site specific drug delivery "in vivo". *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, v.58, p.141-146, 1978.

WIDDER, K.J.; MORRIS, R.M.; POORE, G.A.; HOWARDS, D.P.; SENYEI, A.E. Selective targeting of magnetic albumin microspheres containing low-dose doxorubicin: Total remission in Yoshida sarcoma-bearing rats. *Eur. J. Cancer Clin. Oncol.*, v.19, p.135-139, 1983.

WILLIAMS, C. In: BARUCHEL, J.; HODEAN, J.L.; LECHMAN, M.S.; REGNARD, J.R.; SCHLENKER, C. *Diffraction, refraction and absorption of X-rays and neutrons: a comparative exposition*. Paris: Springer Verlag, 1993, p.3-21.

WILLMOTT, N.; CUMMINGS, J. Increased anti-tumour effect of adriamycin-loaded albumin microspheres is associated with anaerobic reduction of drug in tumour tissue. *Biochem. Pharmacol.*, v.36, p.521-6, 1987.

WINSOR, P.A. Hidrotody, solubilization, and related emulsification processes. *J. Chem. Trans. Farad. Soc.*, London, v.44, p.376-398, 1948.

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

YOKAYAMA, M., MIYAUCHI, M., YAMADA, N., OKANO, T., KATAOKA, K., INOUE, S. Polymer micelles as novel drug carrier: adriamycin-conjugated poly(ethylene glycol)poly(aspartic acid) block copolymer. *J. Contr. Rel.*, v.11, p.269-78, 1990.

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.

ZANIN, S.M.W.; MIGUEL, M.D.; CHIMELLI, M.C.; OLIVEIRA, A.B. Determinação do equilíbrio hidrófilo-lipófilo (EHL) de óleos de origem vegetal. *Vis. Acad.*, v.3; p.13-18, 2002.

VIII. ANEXO

8.1 Artigos publicados:

1. 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, p.301-313, 2005.
2. 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 and Surfaces B-Biointerfaces*, v.51, p.54-61, 2006.
3. FORMARIZ, T.P.; CHIAVACCI, L.A.; SARMENTO, V.H.S.; 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 and Surfaces B-Biointerfaces*, v.60, p.28-35, 2007.
4. FORMARIZ, T.P.; CHIAVACCI, L.A.; SARMENTO, V.H.S.; FRANZINI, C.M.; SILVA-JÚNIOR, 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 phosphatidylcholine and its relationship with doxorubicin release. *Colloids and Surfaces B-Biointerfaces*, v.63, p.287-295, 2008.
5. 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 (COLSUB-S-08-00172). *Colloids and Surfaces. B, Biointerfaces*, In press, 2008.

8.2. Parecer comitê de ética

8.1 ARTIGOS PUBLICADOS:

Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas
Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences
vol. 41, n. 03, jul./set., 2005

RBCF

Microemulsões e fases líquidas cristalinas como sistemas de liberação de fármacos

Thalita Pedroni Formariz^{1,2}, Maria Cristina Cocenza Urban¹, Arnóbio Antônio da Silva Júnior¹,
Maria Palmira Daflon Gremião¹, Anselmo Gomes de Oliveira^{1*}

¹Departamento de Fármacos e Medicamentos, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista, ²Centro Universitário de Araraquara

A mistura de tensoativos com água, em determinadas proporções, na ausência ou na presença de substâncias lipofílicas pode formar diferentes tipos de agregados, entre os quais agregados polimorfos representados pelas microemulsões (ME) e mesofases liotrópicas - os cristais líquidos (LC), que estão intimamente ligados com a proporção e a natureza dos componentes da mistura. Nesse trabalho, foi discutido o papel desses sistemas na incorporação de fármacos com diferentes propriedades físico-químicas, influenciando fortemente a liberação, assim como a biodisponibilidade dos fármacos. Aspectos sobre a formação e a caracterização de microemulsões e cristais líquidos também foram discutidos. A análise da literatura indicou que, dependendo da polaridade do fármaco, o efeito da ME ou LC pode ser usado para otimizar o efeito terapêutico por meio do controle da velocidade ou do mecanismo de liberação do fármaco.

Unitermos

- Microemulsões
- Cristais líquidos
- Diagrama de fases
- Sistemas de liberação de fármacos

*Correspondência:

A. G. Oliveira
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
de Araraquara
Rodovia Araraquara-Jd., Km 01, 14801-
902 - Araraquara - SP - Brasil
E-mail: oliveag@cfar.unesp.br

INTRODUÇÃO

A formação de microestruturas em soluções aquosas de tensoativos é um fenômeno comum de auto-organização molecular como forma de atingir a estabilidade termodinâmica. Esse fenômeno torna-se a base para a aplicação tecnológica dos tensoativos como sistemas organizados nas ciências biológicas.

Moléculas de tensoativos comumente se auto-agregam na presença de água formando uma rica variedade de estruturas, quando são variados os parâmetros de concentração de tensoativos, presença de sal ou a temperatura. Em soluções diluídas, soluções isotrópicas de agregados micelares podem ser formadas, enquanto que em sistemas

tensoativo-solvente em concentrações mais elevadas, fases líquido-cristalinas isotrópicas e anisotrópicas podem existir. Esses agregados tornam-se mais estruturados quando um óleo ou mesmo outros componentes, como outro tensoativo ou um álcool de cadeia média, é adicionado ao sistema tensoativo-água. Dessa forma, emulsões, microemulsões e mesofases liotrópicas de diferentes geometrias podem ser geradas (Ezrahi *et al.*, 1999).

Nos últimos anos a procura por novos sistemas de liberação de fármacos tem sido muito relevante no sentido de se estabelecer alternativas terapêuticas mais eficientes, que possibilitem administrar os fármacos com mais segurança e com efeitos colaterais minimizados (Cera, 2001).

Uma parte desses trabalhos tem sido dirigida para o estudo de microemulsões (ME) e cristais líquidos, visando ao aumento da solubilidade e da estabilidade de fármacos, a possibilidade de incorporação de fármacos hidrofílicos ou lipofílicos, a capacidade de agir como sistemas reservatórios, a diminuição da toxicidade, assim como a alteração da biodisponibilidade, dependendo do tipo de interação entre fármaco e o sistema de administração (Constantinides *et al.*, 1995; Constantinides, 1995; Brinon *et al.*, 1999; Gabboun *et al.*, 2001).

MICROEMULSÕES

Muita atenção tem sido dada aos sistemas micro- e nanoestruturados de tensoativos, por sua capacidade em aumentar a eficácia terapêutica de fármacos, permitindo a redução da dose administrada e minimizando os efeitos colaterais potenciais dos fármacos. Os sistemas micro- e nanoemulsionados são capazes de compartimentalizar fármacos nas gotículas da fase interna, as quais possuem propriedades físico-químicas bastante diferentes das do meio dispersante, induzindo modificações nas propriedades biológicas dos fármacos incorporados (Bhargava *et al.*, 1987). Além disso, esses sistemas melhoram a solubilização de fármacos lipofílicos em água e os protegem contra hidrólise enzimática, além de aumentar o potencial de absorção devido à presença de tensoativo (Cruz, Uckun, 2001).

Microemulsões (ME) podem ser definidas como 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 (Friebert, Bothorel, 1988; Constantinides *et al.*, 1994, 1995, 1996; Lee *et al.*, 1995; Ho *et al.*, 1996; Lawrence, 1996; Oliveira *et al.*, 1997; Dalmora, Oliveira, 1999; Dalmora *et al.*, 2001). Entretanto, a possibilidade de formar microemulsão depende do balanço entre as propriedades hidrofílicas e lipofílicas do tensoativo, determinada não somente pela sua estrutura química, mas também por outros fatores como temperatura, força iônica e a presença de co-tensoativo. A mistura de tensoativos com equilíbrio hidrófilo-lipófilo adequado proporciona a condição máxima de "solubilização" do óleo e da água (Mital, 1999). Assim, a formação da microemulsão geralmente envolve a combinação de três a cinco componentes, tais como tensoativo, água, óleo e, quando necessário, o co-tensoativo (Lawrence, 1996; Oliveira *et al.*, 1997; Dalmora, Oliveira, 1999; Cruz, Uckun, 2001), sendo que a orientação para sistemas O/A ou A/O é dependente das propriedades físico-químicas do tensoativo e do óleo, da relação entre

as proporções tensoativo/co-tensoativo e entre as proporções água/óleo (Constantinides *et al.*, 1994; Oliveira *et al.*, 1997; Cruz, Uckun, 2001). A principal característica desses sistemas é formar uma emulsão muito fina por homogeneização suave com fase aquosa, cujas dimensões das gotículas da fase interna é da ordem de nanômetros. As ME 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; Dalmora, Oliveira, 1999; Cruz, Uckun, 2001).

O termo microemulsão foi introduzido por Hoar e Schulman, em 1943, os quais descreveram esses sistemas como transparentes ou translúcidos, obtidos por titulação a partir de uma emulsão comum, a qual apresenta aspecto leitoso e, quando adicionado um álcool de cadeia média, este sistema clarifica (Garti, Aserin, 1996).

O tensoativo pode ser puro, mistura, ou combinação com outros componentes, cuja principal função é a redução da tensão interfacial (Cruz, Uckun, 2001). Para a formação espontânea dos sistemas microemulsionados, a tensão interfacial deve estar próxima de zero. Esse sistema apresenta algumas vantagens tais como transparência, alta estabilidade, fácil preparação e capacidade de incorporar diferentes classes de fármacos com diferentes propriedades físico-químicas (Aboofazeli *et al.*, 2000).

Um sistema de classificação que define os vários equilíbrios existentes entre a microemulsão e as fases aquosa e oleosa foi proposto (Winsor, 1948). Foram estabelecidos quatro tipos de sistemas: 1) *Winsor I*- É representado pelo equilíbrio entre a fase emulsionada com a fase oleosa em excesso. Por possuir densidade menor que a da emulsão, a fase oleosa posiciona-se acima da emulsão; 2) *Winsor II*- Representa o equilíbrio entre a fase emulsionada e a fase aquosa em excesso. Por possuir densidade menor que a da fase aquosa, a emulsão posiciona-se na parte superior à fase aquosa; 3) *Winsor III*- Existem três fases em equilíbrio, óleo, emulsão e água, em que o óleo é a fase superior, a emulsão a fase intermediária e a água, a fase inferior; 4) *Winsor IV*- É um sistema em que apenas existe a fase microemulsão, isto é, um sistema visualmente monofásico. A Figura 1 mostra detalhes do sistema de Winsor.

A natureza e estrutura do tensoativo, co-tensoativo e óleo são fatores essenciais na formulação de sistemas microemulsionados. A construção de diagramas de fase

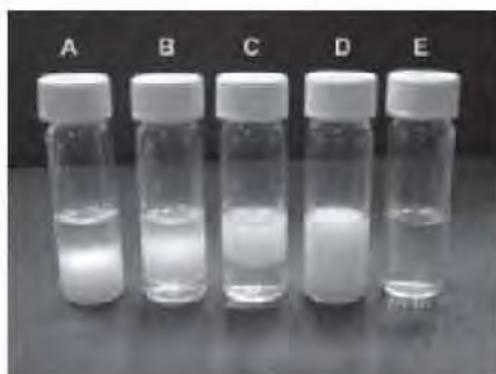


FIGURA 1 - Representação da classificação de Winsor. A) Winsor I. B) Winsor III. C) Winsor II. D) Emulsão homogênea. E) Winsor IV.

pode ser uma ferramenta fundamental para caracterizar em que condições experimentais as ME existem e em que proporções dos componentes outras estruturas podem estar presentes. A partir desses dados, pode-se selecionar a região do diagrama de fases que mais convenientemente represente a condição mais apropriada para que o fármaco seja incorporado (Formariz, 2004).

Os diagramas pseudoternários podem ser obtidos a partir de dados de titulação ou pela preparação de amplo número de amostras com diferentes proporções dos componentes. A vantagem do primeiro método é que este pode ser usado para estudar amplo número de amostras de diferentes composições de maneira rápida (Bhargava *et al.*, 1987; Lawrence, Rees, 2000). Normalmente, os sistemas microemulsionados podem ser diferenciados visualmente dos outros sistemas, uma vez que os demais sistemas apresentam como emulsões líquidas opacas, emulsões géis opacas, representadas por sistemas de viscosidade elevada, ou com separação de fases. Já os sistemas microemulsionados líquidos são caracterizados como sistemas translúcidos ou opticamente transparentes (Formariz, 2004).

A literatura mostra que a adição de um co-tensoativo diminui o tamanho das gotículas e amplia as regiões de microemulsões (Kuneida *et al.*, 1999). Dessa forma, o tamanho da gotícula é fortemente afetado pela mistura de tensoativo no sistema, havendo tendência à diminuição do tamanho das gotículas com o aumento da concentração de tensoativo, gerando sistema opticamente transparente ou translúcido (Lunberg *et al.*, 1996). Isso ocorre porque a mistura de tensoativo com um co-tensoativo é mais eficiente em reduzir a tensão interfacial entre óleo-água, proporcionando a redução

máxima do tamanho das gotículas da fase interna (Trotta *et al.*, 2002).

Microemulsões podem formar várias estruturas, tais como gotículas de óleo em água, gotículas de água em óleo, misturas randômicas bicontínuas, gotículas ordenadas e misturas lamelares com ampla faixa de equilíbrio entre elas e com excesso de fase oleosa e/ou aquosa, sendo que a formação dessas estruturas depende do tensoativo, do co-tensoativo e da natureza do óleo. Portanto, a escolha adequada e as concentrações desses componentes tornam-se extremamente importantes para a orientação desses sistemas (Sirotti *et al.*, 2002). Deve-se ressaltar que tensoativos não-iônicos e zwitteriônicos são mais aceitáveis para aplicações farmacêuticas e formulações microemulsionadas porque são menos afetados pelas mudanças de pH e força iônica e contornam problemas de toxicidade (Cruz, Uckun, 2001).

Do ponto de vista microestrutural, as ME podem ser do tipo água em óleo (A/O), óleo em água (O/A) ou estruturas bicontínuas (Cruz, Uckun, 2001) (Figura 2). Nas microemulsões do tipo A/O, o componente hidrofílico é disperso na forma de gotículas coloidais no componente lipofílico. Já nas ME do tipo O/A, o componente lipofílico é disperso na forma de gotículas coloidais no componente hidrofílico (Mo *et al.*, 2000; Cruz, Uckun, 2001) e ambas podem ser invertidas de A/O para O/A ou vice-versa ao variar as condições de emulsificação (Mo *et al.*, 2000). Em relação ao último tipo de sistema microemulsionado, os componentes hidrofílicos e lipofílicos formam microemulsão com estrutura bicontínua, com canais adjacentes alongados com gotículas na faixa de 1-100 nm (Cruz, Uckun, 2001), como uma rede de tubos aquosos em matriz oleosa ou rede de tubos oleosos em matriz aquosa (Mo *et al.*, 2000), e contendo volumes relativos aproximadamente iguais entre a fase aquosa e oleosa (Lawrence, Rees, 2000; Mo *et al.*, 2000; Cruz, Uckun, 2001). Se a microemulsão apresentar tal estrutura, essa poderá ser utilizada como sistema transportador de fármacos hidro e lipossolúveis (Cruz, Uckun, 2001).

Sistemas microemulsionados são geralmente caracterizados como agregados esféricos e com diâmetros menores que 1400 Å, geralmente de 100 Å (Langevin, 1988; Oliveira, Scarpa, 2001; Oliveira *et al.*, 2004). Essa afirmação baseia-se no fato de, em um sistema coloidal, se o diâmetro das gotículas for menor do que $\frac{1}{4}$ do comprimento de onda da luz incidente, as partículas não espalham luz, resultando em sistema opticamente transparente (Rosano, 1974; Oliveira, Scarpa, 2001). Porém, quando esses sistemas são caracterizados por técnicas de espalhamento de raios-X a baixo ângulo (SAXS) e de espalhamento de nêutrons a baixo ângulo (SANS), indi-

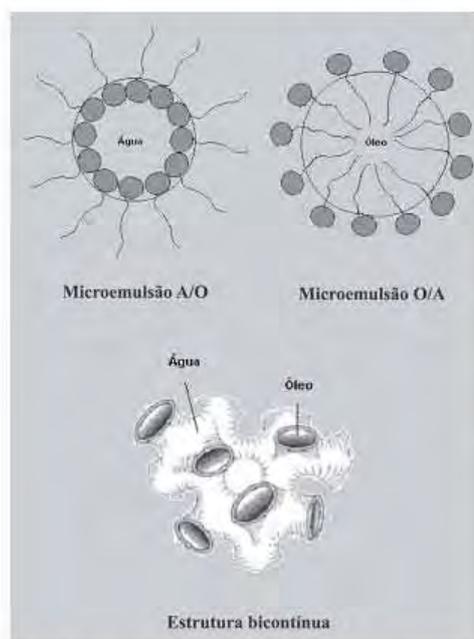


FIGURA 2 - Representação esquemática da organização das microemulsões (Castillo, 2002).

cam que o óleo e a água não são dispersões moleculares e, sim, misturas mais grosseiras (Lindman, Friberg, 1999).

Os meios dispersos apresentam a propriedade de espalhar as ondas eletromagnéticas (como a luz), que venham atravessá-los. Este fenômeno depende do tamanho das gotículas que compõem o sistema disperso e do comprimento de onda utilizado (Silva, 2001). A diafanidade de um meio pode ser utilizada para identificar as ME e estimar de forma grosseira o tamanho das gotículas. A tabela a seguir

TABELA I - Tamanho de agregado (gotículas dispersas) e diafanidade do meio (Silva, 2001)

Agregados	Diâmetro das gotículas (Å)	Diafanidade
Micelas	35-75	Transparentes
Microemulsões	100-2000	Transparentes/ Translúcidas
Emulsões	2000-100000	Opaca/ Esbranquiçada
Unidade de resolução visual	500000	Discretos agregados

relaciona o diâmetro de alguns agregados e como estes se apresentam, quanto à dispersão da luz.

O fenômeno de dispersão da luz pelas microemulsões pode ser avaliado de maneira eficiente através da técnica de "Light Scattering", a qual fornece informações diretas sobre o movimento translacional das gotículas da ME e permite o cálculo do tamanho da gotícula através de relações empíricas adequadas (Aboofazeli *et al.*, 2000). Nota-se, no entanto, que se o sistema é concentrado, ou seja, quando a fase dispersa estiver em elevadas concentrações, a interpretação torna-se dificultada em razão das interações intergotículas. Para suprimir a interação entre gotículas a diluição do sistema microemulsionado com a fase dispersante é necessária (Hou *et al.*, 1988; Lawrence, Rees, 2000; Aboofazeli *et al.*, 2000).

Sistemas com elevada viscosidade, também podem conter erros experimentais no tamanho das gotículas (Aboofazeli *et al.*, 2000), em razão de que a técnica de determinação é fundamentada no movimento Browniano das gotículas em dispersão, sendo o coeficiente de difusão das gotículas no meio o principal parâmetro levado em consideração (Orthaber, Glatter, 2000).

A determinação da densidade, viscosidade, espalhamento de luz, índice de refração são importantes como técnicas de caracterização física (Constantinides *et al.*, 1995). A literatura refere que técnicas experimentais diferentes podem ser usadas para obter informações sobre a dinâmica e estrutura das ME (Kahlweit *et al.*, 1987). Diferenças de viscosidade podem diferenciar sistemas microemulsionados comuns de sistemas géis. Gotículas de fase interna com tamanhos extremamente pequenos são característica de sistemas termodinamicamente estáveis se esses formarem espontaneamente, mas o aumento do diâmetro com o volume de fase interna, geralmente, leva à modificação da microestrutura interna do sistema, na qual a estrutura esférica das gotículas modifica-se para fases hexagonais e contínuas (Constantinides *et al.*, 1995; Oliveira, 1997; Avramiotis *et al.*, 1997).

A reologia consiste no estudo do escoamento ou deformação do material em estudo quando submetido a uma tensão (Wood, 1986). O método é aplicável na caracterização de sistemas micro e emulsionados, pois o comportamento do fluido está relacionado com o tipo e grau de organização do sistema. Também podem ser empregadas para checar a qualidade durante o processo de produção, além de permitir o estudo do efeito de aditivos na formulação (Scott, 2000).

Os sistemas microemulsionados e emulsionados se comportam na maioria das vezes, como sistemas não-Newtonianos, os quais se caracterizam por mudança na

viscosidade com o aumento da velocidade de cisalhamento, em que a relação entre tensão e velocidade de cisalhamento não é constante e os gráficos apresentam-se como uma curva (Wood, 1986; Scott, 2000). Frequentemente, as ME também estão associadas à tixotropia (Cera, 2001; Formariz, 2004).

Correa e colaboradores (2005) mostraram que a viscosidade aparente de sistemas microemulsionados e emulsionados é dependente do volume de fase e da natureza da fase oleosa, visto que o aumento do volume de fase interna oleosa provocou aumento da viscosidade aparente e que microemulsões com estruturas bicontínuas apresentam valores de viscosidade mais baixos.

A caracterização físico-química dos sistemas emulsionados e microemulsionados, principalmente por estudos de viscosidade e determinação do tamanho das gotículas, pode auxiliar na interpretação dos experimentos de liberação *in vitro* e *in vivo*. O diâmetro das gotículas da fase interna das emulsões e microemulsões assim como a viscosidade do sistema estão diretamente relacionados com a velocidade de liberação *in vitro* e com o processo de difusão *in vivo*, facilitando ou dificultando a fração disponível de fármaco por unidade de tempo (Correa, 2005).

Vias de administração

Dependendo de sua composição, as microemulsões não apresentam restrições em relação às vias de administração, podendo ser aplicadas pela via oral, ocular (Garti, Aserin, 1996), tópica, dérmica (Cruz, Uckun, 2001), transdérmica, parenteral (Garti, Aserin, 1996; Li *et al.*, 2002), pulmonar, vaginal, retal (Cruz, Uckun, 2001) e nasal (Li *et al.*, 2002).

Microemulsões como Sistemas de Liberação de Fármacos

Nos últimos anos, tem aumentado o interesse na aplicação de microemulsões como sistema de liberação de fármacos, já que esses agregados apresentam-se descritos na literatura como sistemas reservatórios e permitem liberação lenta do fármaco, a qual proporciona efeito prolongado, evitando atingir concentração plasmática acima do necessário (Dalmora *et al.*, 2001).

Dispersões coloidais óleo em água representam interessante perspectiva para o desenvolvimento de formulações, pois estas são utilizadas como veículos para liberação de fármacos pouco solúveis em água, especialmente quando administrados pela via parenteral. Porém, esses sistemas requerem alguns cuidados especiais, tais como,

esterilidade, apirogenicidade, isotonicidade, atoxicidade e estabilidade. Além disso, o tamanho das gotículas da fase dispersa deve ser menor do que 1 μ m, pois gotículas de óleo maiores podem causar embolia. As microemulsões obedecem esse último requisito (Trotta, 1999).

Microemulsões lipídicas do tipo O/A são alternativas interessantes como sistemas de liberação de fármacos (Figura 3). A estrutura básica da microemulsão lipídica é um lipídio neutro na região interna, como, por exemplo, um triglicerídeo líquido, estabilizado por lipídios anfífilos, como os fosfolípidos. Esse sistema pode solubilizar quantidade considerável de fármacos lipossolúveis no domínio hidrofóbico da fase interna oleosa e, portanto apresenta potencial de aplicação terapêutico como transportadores de fármacos lipossolúveis (Lundberg *et al.*, 1996).

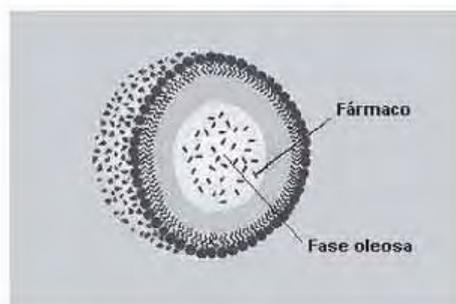


FIGURA 3 - Microemulsão do tipo O/A (Oliveira *et al.*, 2004).

A literatura relata que fármacos parcialmente hidrofílicos solubilizados em sistemas microemulsionados, podem particionar entre a fase contínua, interior da ME e na região interfacial. Portanto, a região interfacial pode não consistir inteiramente de compostos tensoativos. Além disso, a literatura também mostra que o aumento da solubilidade do fármaco nas gotículas dispersas de óleo está relacionado com a partição favorável do mesmo nesta fase e o sistema terá característica de reservatório, apresentando liberação prolongada do fármaco. Essa liberação acontece devido à difusão lenta e contínua de fármaco das gotículas de óleo para a fase contínua (Garti, Aserin, 1996).

As ME do tipo água em óleo (A/O) também têm sido descritas como sistemas transportadores de fármacos hidrofílicos, principalmente para liberação de fármacos por via oral (Ritschel, 1991; Sarciaux *et al.*, 1995; Park, Kim, 1999) e intramuscular (Gasco *et al.*, 1990; Park, Kim, 1999). No caso de microemulsões do tipo A/O, a inversão de fase é uma propriedade interessante, que resulta em

microemulsões do tipo O/A, e estas podem ser usadas para liberação de fármacos via oral (Park, Kim, 1999; Wargaftigi, 2000). A literatura relata que ME A/O, podem ser facilmente invertidas em ME O/A e/ou emulsões múltiplas do tipo água-óleo-água (A/O/A), quando estas são diluídas com excesso de fase aquosa. As microemulsões do tipo O/A apresentam muitas vantagens como sistema de liberação de fármacos, pois estes melhoram a solubilização de fármacos lipofílicos, tornando possível o uso parenteral e permitindo assim, a produção em larga escala industrial sem o uso de energia para a homogeneização (Park, Kim, 1999). Por outro lado, estudos experimentais mostram a melhora na absorção oral, quando se utiliza sistema microemulsionado. Esta melhora é devida à incorporação do fármaco nas gotículas das microemulsões (O/A) e, também, ao aumento específico da área superficial, resultando no intenso contato das gotículas com o trato gastrointestinal. Outro fator importante é o tamanho e a polaridade das gotículas das ME resultante do balanço hidrofílico e lipofílico do tensoativo, pois a variação dessa polaridade influencia a incorporação do fármaco e do tensoativo na interface, alterando a propriedade de liberação do fármaco (Itoh *et al.*, 2002).

Microemulsões também apresentam grande potencial como veículos de liberação de fármacos lipofílicos via intravaginal e retal, tais como, microbicidas, esteróides e hormônios, porque aumentam a capacidade de solubilização de fármacos, aumentam absorção e melhoram a eficiência clínica. Entretanto, o uso desse sistema para administração intravaginal e retal impôs rigorosas exigências no que diz respeito à toxicidade e à biodisponibilidade da formulação, uma vez que, para esse sistema ser considerado adequado para aplicação intravaginal, deve apresentar gotículas com diâmetros de 30-80 nm e os excipientes farmacêuticos usados devem contornar problemas de toxicidade (Cruz, Uckun, 2001).

Cortesi e colaboradores (1997) utilizaram sistemas microemulsionados para solubilizar a camptotecina, alcalóide citotóxico bastante utilizado no tratamento de paciente com câncer, em especial, de pulmão, ovário e mama. A solubilidade desse fármaco é muito baixa, cerca de 1,3 mg/mL, e isto causa sério inconveniente aos pacientes, uma vez que este medicamento só pode ser administrado através de infusões contínuas ou múltiplas injeções diárias, o que resulta em vários efeitos adversos: neutropenia, trombocitopenia, anemia, alopecia, náusea, vômitos, diarreia e erupções cutâneas. Os sistemas microemulsionados aumentaram consideravelmente a solubilidade da camptotecina, pois esta chegou a 500 mg/mL. Esse efeito associado à maior penetração em membranas biológicas pode contribuir para o aumento da absorção gastrointestinal dos

alcalóides e, então, facilitar a administração oral (Cortesi, Nastruzzi, 1999; Formariz *et al.*, 2004).

Trabalhos desenvolvidos em nosso laboratório mostram que ME aumentam significativamente a solubilidade de antiinflamatórios não-esteróides (Dalmora, 1996; Correa, 1996; Dalmora, Oliveira, 1999; Oliveira *et al.*, 2004) e funcionam como sistemas reservatórios, proporcionando atividade terapêutica mais intensa e portempo prolongado. Também foi demonstrado que ME constituem veículo muito mais eficiente que a solução aquosa para administração de vacinas de DNA por via oral (Wargaftigi, 2000; Oliveira *et al.*, 2004). Nesse contexto, os sistemas coloidais de veiculação de fármacos, particularmente as ME, também têm sido utilizados como estratégia para aumentar o índice terapêutico dos quimioterápicos antineoplásicos, com a conseqüente redução dos efeitos adversos (Maranhão *et al.*, 1995; 1996; Mitra *et al.*, 2001; Owens *et al.*, 2001; Formariz, 2004).

A literatura mostra que quando os fármacos são incorporados em sistemas microemulsionados, o transporte é maior do que em cristais líquidos. Esse fato pode ser atribuído às diferenças estruturais desses sistemas, os quais restringem o movimento das moléculas do fármaco, e às interações soluto-solvente no ambiente anisotrópico e isotrópico, visto que os cristais líquidos apresentam alta energia de ativação de difusão de fármacos e baixa difusividade de fármaco (Gabboun *et al.*, 2001).

A análise detalhada dos diagramas de fase mostra que a mistura dos componentes das microemulsões em diferentes proporções podem gerar vários tipos de agregados nos limites desses diagramas. Assim, no domínio dos agregados polimorfos pode-se detectar a existência das emulsões, microemulsões e cristais líquidos (Ezrahi *et al.*, 1999). Nessas várias formas de agregação, microemulsões e cristais líquidos podem influenciar diferentemente a velocidade de liberação dos fármacos (Gabboun *et al.*, 2001).

CRISTAIS LÍQUIDOS

Cristais líquidos constituem uma fase distinta de estruturas condensadas, cujas características físicas os posicionam entre sólidos e fundidos, com parcial ordem/desordem das espécies atômicas. Por essa razão, são também chamados de mesofases, em que o prefixo grego *meso* significa intermediário. Materiais que formam cristais líquidos pela adição de solventes são chamados cristais líquidos liotrópicos, enquanto cristais líquidos termotrópicos têm sua estabilidade dependente da temperatura (Hyde, 2001).

Mesofases liotrópicas contêm, no mínimo, dois componentes: o componente orgânico, por exemplo, tensoativo e seu solvente. A porção orgânica deve exibir certa complexidade química, do contrário, o solvente iria simplesmente

te solubilizar a molécula, originando soluções moleculares de moléculas dispersas e desordenadas, e certamente não seriam formados cristais líquidos. A adição de um solvente, tal como a água, irá hidratar seletivamente a porção hidrofílica das moléculas de tensoativo, evitando as regiões hidrofóbicas (Hyde, 2001).

O fenômeno essencial comum aos estados cristalinos é a presença de orientação ordenada das interfaces. A fim de caracterizar o comportamento de fase de sistemas líquido-cristalinos, é necessário conhecer a existência de outras mesofases, as quais não são (*stricto sensu*) cristais líquidos, como microemulsões isotrópicas, mesofases esponjosas e emulsões, cujas interfaces não possuem qualquer tipo de ordem orientacional (Ezrahi *et al.*, 1999; Hyde, 2001).

Mesofases liotrópicas podem ser consideradas micelas ordenadas com arranjo molecular caracterizado por regiões hidrofóbicas e hidrofílicas alternadas. Conforme o aumento da concentração de tensoativo, diferentes formas líquido-cristalinas podem ser formadas, como lamelares, hexagonais e cúbicas (Gabboun *et al.*, 2001).

A fase lamelar (designada L_2) é formada por camadas paralelas e planas de bicamadas de tensoativo separadas por camadas de solvente, formando rede unidimensional (Figura 4-A). Já na fase hexagonal, os agregados são formados pelo arranjo de cilindros longos, originando estruturas bidimensionais. Na fase H_I (fase normal), as moléculas do tensoativo se agrupam em micelas cilíndricas circulares, com água preenchendo o volume entre os cilindros, enquanto que na fase H_{II} (fase reversa), os cilindros contêm canais de água circundados pelas cabeças polares do tensoativo e a porção oleosa localizada ao redor dos cilindros (Figura 4-2) (Ezrahi *et al.*, 1999).

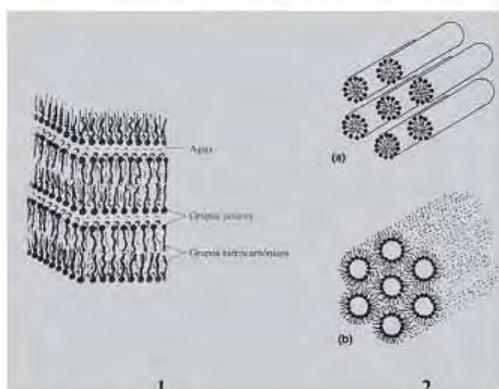


FIGURA 4 - Ilustração esquemática (1) fase lamelar e (2.a) fase hexagonal (2.b) fase hexagonal reversa (Ezrahi *et al.*, 1999).

Fases cúbicas liotrópicas (Figura 5) apresentam estruturas mais complicadas e visualizadas com maior dificuldade que as outras. Quase todas as fases fluidas tridimensionais observadas são de simetria cúbica, apesar das romboédricas, tetragonais e ortorrômbricas de topologia inversa também serem detectadas em alguns sistemas (Ezrahi *et al.*, 1999).

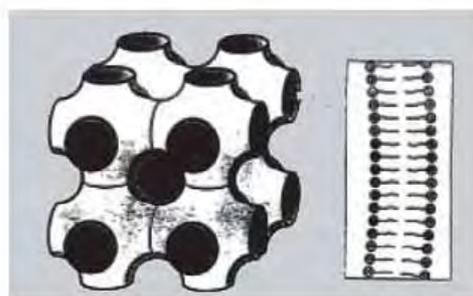


FIGURA 5 - Estrutura da fase cúbica de monoleato de glicerila-água em três dimensões com ampliação mostrando bicamada lipídica (Shah *et al.*, 2001).

Um dos maiores problemas associados ao desenvolvimento de sistemas de liberação de fármacos é, sem dúvida, a escolha dos constituintes. Essa escolha deve ser bastante criteriosa e deve atender alguns requisitos, como não-toxicidade, não-irritabilidade, capacidade de solubilização do fármaco a ser incorporado no sistema, assim como capacidade de formar o sistema desejado (Lawrence, Rees, 2000; Kreilgaard, 2002).

As mesofases líquido-cristalinas são geralmente formadas pela presença de tensoativos da classe dos polioxietilenos, polímeros e lipídeos, como mono e triglicerídeos. Dentre os lipídios mais utilizados na composição desses sistemas, estão a monoleato de glicerila (monoleína) e o monolinoleato de glicerila (Norling *et al.*, 1992; Carr *et al.*, 1997; Chang, Bodmeier, 1997; Lee, Kellaway, 2000; Urban, 2004). Dependendo da temperatura e da concentração dessas moléculas em água, formam-se agregados bem estruturados, tais como fases cúbicas, hexagonais ou lamelares (Brinon *et al.*, 1999; Farkas *et al.*, 2001; Gabboun *et al.*, 2001).

Caracterização físico-química

As mesofases líquido-cristalinas podem ser grosseiramente caracterizadas verificando-se a viscosidade. A fase lamelar geralmente apresenta-se como líquido viscoso e a fase hexagonal tem a viscosidade semelhante à de um

gel, enquanto que a viscosidade da fase cúbica é extremamente elevada (Gabboun *et al.*, 2001; Hyde, 2001). Medidas de reologia são utilizadas a fim de se determinar a viscosidade dinâmica, obtendo-se como resultado a curva de viscosidade em relação ao fluxo e à visco-elasticidade, por meio dos parâmetros módulo de armazenagem (G') e módulo de perda (G''), obtendo-se, neste caso, informação sobre a aparência das amostras (Schramm, 2002).

Uma das maneiras de classificar as fases líquido-cristalinas é determinar sua isotropia óptica, através da técnica de microscopia de luz polarizada. Sob um plano de luz polarizada, a amostra é anisotrópica se for capaz de desviar o plano da luz incidente e isotrópica se não desviar a luz. Mesofases lamelares e hexagonais são anisotrópicas, enquanto as cúbicas são isotrópicas (Norling *et al.*, 1992; Brinon *et al.*, 1999; Hyde, 2001).

Para análises mais aprofundadas da estrutura das mesofases, disposição das interfaces, tamanho de micelas, diversas técnicas mais sofisticadas são comumente utilizadas, como microscopia eletrônica de criofractura (Ezrahi *et al.*, 1999), difração de nêutrons (Hyde, 2001), espalhamento de raios-X a baixo ângulo (SAXS), espalhamento de nêutrons a baixo ângulo (SANS) (Farkas *et al.*, 2001) e calorimetria exploratória diferencial (DSC) (Farkas *et al.*, 2000).

Vias de administração

As mesofases líquido-cristalinas podem ser administradas através de diversas vias, como oral, retal, subcutânea, tópica, transdérmica, intramuscular e endovenosa (Miyazaki *et al.*, 1986; Wyatt, Dorschel, 1992; Carr *et al.*, 1997; Brinon *et al.*, 1999; Lee, Kellaway, 2000; Urban, 2004).

Para administração oral, o sistema contendo o fármaco deve ser fundido e colocado em cápsulas, de modo a ser ingerido e, então, transformado *in situ* na fase cúbica após contato com os fluidos gastrintestinais (Wyatt, Dorschel, 1992).

Já para a administração parenteral, a fase cúbica e o próprio monoglicerídeo apresentam-se muito viscosos para administração direta, tanto intramuscular como subcutânea. Dessa forma, é necessário que o sistema de liberação apresente baixa viscosidade para que possa ser injetado e se transforme, posteriormente, em fase cúbica (Chang, Bodmeier, 1998).

Cristais Líquidos como Sistemas de Liberação de Fármacos

Esses sistemas podem ser considerados como micelas ordenadas com arranjo molecular caracterizado por regiões hidrofílicas e lipofílicas alternadas. Os

fármacos, quando incorporados nesses sistemas, poderão residir nessas duas regiões e também na bicamada de tensoativo da mesofase, dependendo da solubilidade do fármaco (Muller-Goymann, Frank, 1986).

As interações fármaco-sistema desempenham importante papel no controle da liberação. Entretanto, a razão de liberação de fármacos incorporados em sistemas líquido-cristalinos dependerá da estrutura da mesofase assim como das características físico-químicas do fármaco. Essas propriedades tornam possível a utilização de cristais líquidos como veículos transportadores de fármacos, os quais podem ser capazes de controlar a liberação das substâncias neles incorporados (Gabboun *et al.*, 2001).

Como consequência da interação fármaco-solvente, sob certas condições, os fármacos solubilizados podem induzir mudanças no empacotamento molecular do sistema. Este efeito pode influenciar a razão de liberação *in vitro* (Muller-Goymann, Frank, 1986; Ibrahim *et al.*, 1993; Farkas *et al.*, 2001).

Miyazaki e colaboradores (1986) utilizaram géis de Pluronic F-127, os quais se apresentaram como cristais líquidos isotrópicos de alta viscosidade, para liberação controlada de fármacos pelas vias tópica e retal. Nestes casos, as fases géis líquido-cristalinas apresentaram-se como sistemas reservatórios para a indometacina, que foi liberada por difusão através dos canais de água da matriz do gel.

Além de afetar a liberação do fármaco, a mesofase pode alterar a direção do seu movimento, assim como aumentar sua solubilidade, em função das regiões de diferentes polaridades existentes nesses sistemas (Farkas *et al.*, 2001).

Entre as inúmeras vantagens apresentadas pelos cristais líquidos como veículos para administração de fármacos, a literatura também tem demonstrado propriedades bioadesivas das fases cúbicas e lamelares, embora o mecanismo de bioadesão ainda não esteja completamente elucidado (Engström *et al.*, 1995; Nielsen *et al.*, 1998).

A fase cúbica exerce ação protetora contra degradação enzimática de fármacos peptídicos e o aumento da estabilidade química de compostos contendo pontes amídicas (Nielsen *et al.*, 1998).

Gabboun e colaboradores (2001) estudaram a liberação de ácido salicílico, diclofenaco ácido e seus sais incorporados em sistemas estruturados liotrópicos anisotrópicos (fases lamelar e hexagonal) e isotrópicos (sistema micelar) através da pele de ratos sem pêlo. As mesofases foram preparadas a partir da mistura do tensoativo polioxietileno (20) hexadecil éter em água ou tampão de ácido clorídrico pH 1. Os resultados indicaram que o transporte de ácido salicílico foi maior quando incorporado em sistemas isotrópicos micelares do que em anisotrópicos (alta energia de ativação de difusão de

fármacos e baixa difusividade de fármacos), e que o transporte de diclofenaco ácido e seus sais através da pele foi cerca de 30 vezes menor que o do ácido salicílico. Esses resultados podem ser atribuídos às diferenças estruturais desses compostos, que restringem o movimento das moléculas do fármaco, e às interações soluto-solvente no ambiente anisotrópico e isotrópico, causando a liberação do diclofenaco e seus sais em diferentes razões.

CONCLUSÕES

Microemulsões e cristais líquidos podem modificar profundamente a velocidade de liberação de fármacos, oferecendo benefícios que incluem o aumento da solubilidade e absorção e controle da biodisponibilidade de fármacos. Como sistemas reservatórios podem alterar os parâmetros farmacocinéticos, diminuindo a toxicidade e aumentando a eficácia clínica de fármacos.

ABSTRACT

Microemulsion and liquid crystals as drug delivery systems

Depending on the proportions, the mixture of surfactants with water, in the presence or absence of oil, may form different types of supramolecular aggregates. Among these, polymorphic structures represented by microemulsions (ME) and lyotropic mesophases-liquid crystals (LC), closely related with the nature and the proportion of the constituents, can exist. In this work, the role of these systems in the incorporation of drugs with different physico-chemical properties, influencing strongly the drug release as well as the bioavailability of the drugs, was discussed. Aspects about the formation and the characterization of ME and LC were also discussed. The analysis of the literature indicate that depending on the drug polarity the effect of ME or LC can be used to optimizes therapeutic effects through the control of rates and the drug release mechanisms.

UNITERMS: Microemulsion. Liquid crystals. Phase diagram. Drug delivery systems.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABOOFAZELI, R.; BARLOW, D.; LAWRENCE, M.J. Particle size analysis of concentrated Phospholipid microemulsions II. Photon correlation spectroscopy. *APPS PharmSci*, Arlington, v.2, n.3, E.19, 2000.
- AVRAMIOTIS, S.; BECKIARI, V.; LIANOS, P.; XENASKIS, A. Structural and dynamic properties of lecithin-alcohol based w/o microemulsions: A luminescence quenching study. *J. Coll. Int. Sci.*, London, v.195, p.326-331, 1997.
- BHARGAVA, H.N.; NARURKAR, A.; LIEB, L.M. Using microemulsions for drug delivery. *Pharm. Technol.*, Duluth, v.3, p.46-54, 1987.
- BRINON, L.; GEIGER, S.; ALARD, V.; DOUCET, J.; TRANCHANT, J-T.; COUARRAZE, G. Percutaneous absorption of sunscreens form liquid crystalline phases. *J. Control. Rel.*, Arlington, v.60, p.67-76, 1999.
- CAAR, M.G.; CORISH, J.; CORRIGAN, O.I. Drug delivery from a crystalline base across Visking and human stratum corneum. *Int. J. Pharm.*, Amsterdam, v.157, p.35-42, 1997.
- CASTILLO, R. Surfactants and Microemulsions, 2002. [On-line] Disponível em: <http://www.fisica.unam.mx/liquids/tutorials/microemulsions.htm> Acesso em: 15 jun. 2004.
- CERA, R.F.L. *Estudo da incorporação do diclofenaco sódico com microemulsão lipídicas: formulação e liberação in vitro*. Araraquara, 2001. 145p. [Dissertação de Mestrado. Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista].
- CHANG, C-M.; BODMEIER, R. Low viscosity monoglyceride-based drug delivery systems transforming into a highly viscous cubic phase. *Int. J. Pharm.*, Amsterdam, v.173, p.51-60, 1998.
- CONSTANTINIDES, P.P.; WELZEL, G.; ELLENS, H.; SMITH, P.L.; STURGIS, S.; YIV, S.H.; OWEN, A.J. Water in oil microemulsions containing medium-chain fatty acid/salts: formulation and intestinal absorption enhancement evaluation. *Pharm. Res.*, Arlington, v.13, p.210-215, 1996.
- 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.*, Arlington, v.34, p.109-116, 1995.

- CONSTANTINIDES, P.P. Lipid microemulsions for improving drug dissolution and oral absorption: physical and biopharmaceutical aspects. *Pharm. Res.*, Arlington, v.12, p.1561-1572, 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.*, Arlington, v.11, p.1385-1390, 1994.
- CORREA, M.A.; SCARPA, M.V.; FRANZINI, M.C.; OLIVEIRA, A.G. On the incorporation of the non-steroidal anti-inflammatory naproxen into cationic O/W microemulsions. *Colloids Surf. B*, Amsterdam, v.43, p.106-112, 2005.
- CORREA, M.A. *Incorporação de naproxeno em sistema microemulsionado: liberação in vitro e avaliação biológica*. São Paulo, 1996. 146p. [Tese de Doutorado. Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo].
- CORTESI, R.; ESPOSITO, E.; MAIETTI, A.; MENEGATTI, E.; NASTRUZZI, C. Formulation study for the antitumor drugs camptothecin: Liposomes, micellar solution and a microemulsion. *Int. J. Pharm.*, Amsterdam, v.159, p.95-103, 1997.
- CORTESI, R.; NASTRUZZI, C. Liposomes, micelles and microemulsion as new delivery systems for cytotoxic alkaloids. *Pharm. Sci. Technol.*, Amsterdam, v.2, n. 7, p.288-298, 1999.
- CRUZ, D'J.O.; UCKUN, M.F. Gel-microemulsions as vaginal spermicidal and intravaginal drug delivery vehicles. *Contraception*, Stoneham, v. 64, p.113-123, 2001.
- 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.*, Amsterdam, 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.*, Amsterdam, v.184, p.157-164, 1999.
- DALMORA, M.E.A. *Interação do piroxicam com microemulsão e β -ciclodextrina: formulação liberação in vitro e avaliação biológica*. Santa Maria, 1996. 147p. [Dissertação de Mestrado. Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Santa Maria].
- ENGSTRÖM, S.; LJUSBERG-WAHREN, H.; GUSTAFSSON, A. Bioadhesive properties of the monoolein-water system. *Pharm. Tech. Europe*, Chester, v.7, p.14-17, 1995.
- EZRAHI, S.; ASERIN, A.; GARTI, N. Aggregation behavior in one-phase (Winsor IV) microemulsion systems. In: KUMAR, P.; MITTAL, K.L., ed. *Handbook of Microemulsion Science and Technology*. New York: Marcel Dekker, 1999. cap.7, p.195-240.
- FARKAS, E.; ZELKÓ, R.; TÖRÖK, Gy.; RÁCZ, I.; MARTON S. Influence of chlorhexidine species on the liquid crystalline structure of vehicle. *Int. J. Pharm.*, Amsterdam, v.213, p.1-5, 2001.
- FARKAS, E.; ZELKÓ, R.; NÉMETH, Zs.; PÁLINKÁS, J.; MARTON S.; RÁCZ, I. The effect of liquid crystalline structure on chlorhexidine diacetate release. *Int. J. Pharm.*, Amsterdam, v.193, p.239-245, 2000.
- 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*, Brasília, v.16, n. 1, p.44-57, 2004.
- FORMARIZ, T.P., *Incorporação da doxorubicina em microemulsões estabilizadas por fosfatidilcolina de soja e estudo da atividade antiproliferativa "in vitro" através de cultura de células*. Araraquara, 2004. 199p. [Dissertação de Mestrado. Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista].
- FRIBERG, S.E.; BOTHOREL, P. *Microemulsions: Structure and dynamics*. New York: CRC, 1988. 219p.
- GABBOUN, N.H.; NAJIB, N.M.; IBRAHIM, H.G.; ASSAF, S. Release of salicylic acid and diclofenac acid salts from isotropic and anisotropic nonionic surfactant systems across rat skin. *Int. J. Pharm.*, Amsterdam, v.212, p.73-80, 2001.

- GARTI, N.; ASERIN, A. Pharmaceutical emulsions, double emulsion and microemulsion. In: _____. *Drug and the pharmaceutical science*. New York: Marcel Dekker, 1996. v.73, cap.15, p.412-519.
- GASCO, M.R.; PATARINO, F.; LATTANZI, F. Long-acting delivery systems for peptides: reduced plasma testosterone levels in male rats after a single injection. *Int. J. Pharm.*, Amsterdam, v.62, p.119-123, 1990.
- HUDE, 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, H.; HSIAO, C.C.; SHEU, M.T. Preparation of microemulsions using polyglycerol fatty acid esters as surfactant for the delivery of protein drugs. *J. Pharm. Sci.*, Washington, v.85, p.138-143, 1996.
- HOU, M.J.; KIM, M.; SHAH, D.O. A light-scattering study of on the droplet size and interdroplet interaction in microemulsions of AOT-oil-water system. *J. Coll. Int. Sci.*, London, v.123, p.398-412, 1988.
- IBRAHIM, H.G.; SALLAM, E.; TAKIEDDIN, M.; HABBOUB, M. Effects of solutes characteristics and concentration on a lyotropic liquid crystal: solute-induced phase change. *Pharm. Res.*, Arlington, v.10, p.737-742, 1993.
- ITOH, K.; MATSUI, S.; TOZUKA, Y.; OGUCHI, T.; YAMAMOTO, K. Improvement of physicochemical properties of N-4472. Part II: characterization of N-4472 microemulsion and the enhanced oral absorption. *Int. J. Pharm.*, Amsterdam, v.246, p.75-83, 2002.
- KAHLWEIT, M.; STREY, R.; HAASE, D. How to study microemulsions. *J. Coll. Int. Sci.*, London, v.118, p.436-453, 1987.
- KREILGAARD, M. Influence of microemulsions on cutaneous drug delivery. *Adv. Drug Del. Rev.*, Arlington, v.54, p.77-98, 2002.
- KUNEIDA, H.; UMIZU, G.; YAMAGUCHI, Y. Mixing effect of polyoxyethylene-type nonionic surfactants on the lipid crystalline structures. *J. Coll. Int. Sci.*, London, v.218, p.88-96, 1999.
- LANGEVIN, D. Microemulsions. *Acc. Chem. Res.*, Washington, v.21, p.255-260, 1988.
- LAWRENCE, M.J. Microemulsions as Drug Delivery Vehicles. *Curr. Op. Coll. Int. Sci.*, Gaithersburg, v.1, p.826-832, 1996.
- LAWRENCE, M.J.; REES, D.G. Microemulsions-based as novel drug delivery systems. *Adv. Drug Del. Rev.*, Arlington, v.45, p.89-121, 2000.
- LEE, J.; KELLAWAY, I.W. Buccal permeation of [D-Ala², D-Leu⁵]enkephalin from liquid crystalline phases of glyceryl monooleate. *Int. J. Pharm.*, Amsterdam, v.195, p.35-38, 2000.
- LEE, M.J.; LEE, M.H.; SHIN, C.K. Inverse targeting of drugs to reticuloendothelial system-rich organs by lipid microemulsion emulsified with poloxamer 338. *Int. J. Pharm.*, Amsterdam, v.113, p.175-187, 1995.
- LI L.; NANDI, I.; KIM, H.K. Development of an ethyl laurate-based microemulsion for rapid-onset intranasal delivery of diazepam. *Int. J. Pharm.*, Amsterdam, v.237, p.77-85, 2002.
- LINDMAN, B.; FRIBERG, S.E. Microemulsions – A historical overview. In: KUMAR, P.; MITTAL, K.L., eds. *Handbook of microemulsion science and technology*. Basel, New York: Dekker, 1999. p.1-12.
- LUNDBERG, B.B.; MORTIMER, B.C.; REDGRAVE, T.G. Submicron lipid emulsions containing amphipathic polyethylene glycol for use as drug-carriers with prolonged circulation time. *Int. J. Pharm.*, Amsterdam, v.134, p.119-127, 1996.
- MARANHÃO, R.C.; HUNGRIA, V.T.M.; CHAMONE, D.A.F.; CHIANOTE, C.S. Microemulsions that bind to LDL receptors (LDE) as vehicles for anticancer drugs: A phase I/Phase II study of complex LDE-carmustina in multiple myeloma patients. *Int. J. Hematol.*, Amsterdam, v.64, p.127, 1996.
- MARANHÃO, R.C.; GRAZIANI, S.R.; BRANDIZZI, L.L.; COELHO, I.J.; OLIVIRA, M.A.; HEGG, R.; PINOTTI, J.A.; PILLEGGI, F.; MENEGUETTI, C. A microemulsion resembling low-density protein may be used as a vehicle of chemotherapeutic agents in mammary carcinoma. *Can. J. Infect. Dis.*, Winnipeg, v.6, p.227c, 1995.

- MIYAZAKI, S.; YOKOUCHI, D.; NAKAMURA, T.; HASHIGUSHI, N.; HOU, W.M.; TAKADA, M. Pluronic F-127 gels as a novel vehicle for rectal administration of indomethacin. *Chem. Pharm. Bull.*, Tokyo, v.34, p.1801-1808, 1986.
- MITRA, S.; GAUR, U.; GHOSH, P.C.; MAITRA, N.A. Tumor targeted delivery of encapsulated dextran-doxorubicin conjugate using chitosan nanoparticles as carrier. *J. Control. Rel.*, Arlington, v.74, p.317-323, 2001.
- MITTAL, L.K. *Handbook of microemulsion science and technology*. New York: Promod Kumar, 1999. p.1-13.
- MO, C.; ZHONG, M.; ZHONG, Q. Investigation of structure and structural transition in microemulsion systems of sodium dodecyl sulfonate + *n*-heptane + *n*-butanol + water by cyclic voltammetric and electrical conductivity measurements. *J. Elect. Chem.*, Amsterdam, v.493, p.100-107, 2000.
- MULLER-GOYMANN, C.C.; FRANK, S.G. Interaction of lidocaine and lidocaine HCl with the liquid crystal structure of topical preparation. *Int. J. Pharm.*, Amsterdam, v.29, p.147-159, 1986.
- NIELSEN, L.S.; SCHUBERT, L.; HANSEN, J. Bioadhesive drug delivery systems I. Characterisation of mucoadhesive properties of systems based on glyceryl mono-oleate and glyceryl mono-linoleate. *Eur. J. Pharm. Sci.*, Arlington, v.6, p.231-239, 1998.
- 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.*, Copenhagen, v.19, p.687-692, 1992.
- 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*, São Paulo, v.27, p.131-138, 2004.
- OLIVEIRA, A.G.; SCARPA, M.V. Microemulsões I: fundamentos teóricos da formação do sistema microemulsionado. *Infarma*, Brasília, v.1, n.8, p.73-79, 2001.
- OLIVEIRA, A.G.; SCARPA, M.V.; CHAIMOVICH, H. Effect of hexadecyltrimethylammonium bromide-based microemulsions on the rate of decomposition of the beta-lactam antibiotic cephaclo. *J. Pharm. Sci.*, Washington, v.86, p.616-620, 1997.
- OLIVEIRA, A.G. *Efeitos cinéticos e mecanismos de micelas e microemulsões nas reações de decomposição de α -aminofenil penicilinas e cefalosporinas*. Araraquara, 1997. 160p. [Tese de Livre-doutorado. Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista].
- ORTHABER, D.; GLATTER, O. Synthetic phospholipid analogs: a structural investigation with scattering methods. *Chem. Physics Lipid*, Amsterdam, v.107, p.179-189, 2000.
- OWENS, D.M.; BAILLIE, G.; HALBERT, W.G. Physicochemical properties of microemulsion analogues of low density lipoprotein containing amphiphatic apoprotein B receptor sequences. *Int. J. Pharm.*, Amsterdam, v.228, p.109-117, 2001.
- PARK, M.K.; KIM, K.C. Preparation and evaluation of flubiprofen-loaded microemulsion for parenteral delivery. *Int. J. Pharm.*, Amsterdam, v.181, p.173-179, 1999.
- RITSCHHEL, W.A. Microemulsion for improved peptide absorption from the gastrointestinal tract. *Meth. Find. Exp. Clin. Pharmacol.*, Barcelona, v.13, p.205-220, 1991.
- ROSANO, H.L. Microemulsions. *J. Soc. Cosmet. Chem.*, Pontiac, v.25, p.609-619, 1974.
- SARCIAUX, J.M.; ACAR, L.; SADO, P.A. Using microemulsion formulations for delivery of therapeutic peptides. *Int. J. Pharm.*, Amsterdam, v.120, p.127-136, 1995.
- SCHRAMM, G. *A practical approach to rheology and rheometry*. 3rd ed. Karlsruhe: ThermoHaake, 2002, 291p.
- SCOOT, H. Rheology. In: REMINGTON, J.P., ed. *The science and practice of pharmacy*. 20th ed. Philadelphia: Editora Lippincott, 2000. cap.23, p.335-335.
- SILVA, C.R.S.H. *Estudo de sistemas microemulsionados para aplicação na extração e formulações de própolis*. Natal, 2001. 106p. [Dissertação de Mestrado. Instituto de Química, Universidade Federal do Rio Grande do Norte].
- SIROTTI, C.; COCEANI, N.; COLOMBO, I.; LAPASIN, R.; GRAS, M. Modeling of drug release from microemulsions: a peculiar case. *J. Membrane Sci.*, Amsterdam, v.204, p.401-412, 2002.

- SHAH, J.S.; SADHALE, Y.; CHILUKURI, D.M. Cubic phase gels as drug delivery systems. *Adv. Drug Deliv. Rev.*, Arlington, v. 47 p. 229–250, 2001.
- TROTTA, M. Influence of phase transformation on indomethacin release from microemulsions. *J. Control. Rel.*, Arlington, v.60, p.399-405, 1999.
- TROTTA, M.; PATTARINO, F.; IGNONI, T. Stability of drug-carrier emulsions containing phosphatidylcholine mixtures. *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, Arlington, v.53, p.2063-208, 2002.
- URBAN, M.C.C. *Desenvolvimento de sistemas de liberação micro e nanoestruturados para administração cutânea do acetato de dexametasona*. Araraquara, 2004. 137p. [Dissertação de Mestrado. Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista].
- WARGAFTIG, T.N. *Desenvolvimento de microemulsões lipídicas estabilizadas com fosfatidilcolina de soja para veiculação de vacina de DNA contra tuberculose*. Araraquara, 2000, 90p. [Dissertação de Mestrado. Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista].
- WINSOR, P.A. Hidrotody, solubilization, and related emulsification processes. *J. Chem. Trans. Faraday Soc.*, London, v.44, n.1, p.376-398, 1948.
- WOOD, J.H. Reologia farmacêutica. In: LACHMAN, L.; LIBERMAN, H.; KANIG, L.J., ed. *Teoria e prática na indústria farmacêutica*. 3 ed. Philadelphia: Lea & Febiger, 1986. v.1, cap.6, p.210-253.
- WYATT, D.M.; DORSCHER, D.A. Cubic-phase delivery system composed of glyceryl monooleate and water for sustained release of water-soluble drugs. *Pharm. Technol.*, Duluth, v.16, p.116, 118, 120, 122, 130, 1992.

Recebido para publicação em 21 de março de 2005.

Aceito para publicação em 12 de julho de 2005.

Available online at www.sciencedirect.com

SCIENCE @ DIRECT®

Colloids and Surfaces B: Biointerfaces 51 (2006) 54–61

COLLOIDS
AND
SURFACES

B

www.elsevier.com/locate/colsurfb

Doxorubicin biocompatible O/W microemulsion stabilized by mixed surfactant containing soya phosphatidylcholine

T.P. Formariz^a, V.H.V. Sarmiento^b, A.A. Silva-Junior^a, M.V. Scarpa^a,
C.V. Santilli^b, A.G. Oliveira^{a,*}

^a Departamento de Fármacos e Medicamentos, Faculdade de Ciências Farmacêutico-UNESP,
Rodovia Araraquara—Jatá km 01, 14801-902 Araraquara, SP, Brazil

^b Departamento de Física-Química, Instituto de Química-UNESP, Rua Francisco Degni,
s/n Quitandinha, 14800-900 Araraquara, SP, Brazil

Received 11 January 2006; received in revised form 5 April 2006; accepted 5 May 2006
Available online 16 May 2006

Abstract

Microemulsions (ME) containing soya phosphatidylcholine (SPC)/polyoxyethylenglycerol trihydroxystearate 40 (EU)/sodium oleate (SO) as surfactant cholesterol (CHO) as oil phase and aqueous buffer were studied. Pseudo-ternary phase diagrams of the investigated systems were obtained at constant SPC/EU/SO weight ratio 3.5:3.5:3.0 by titration, in order to characterize the proportions between the components to form clear systems. The dynamic light scattering results showed that the size of the oil droplets decreases significantly with the ratio of surfactant/oil phase added to system. Depending on the composition ME system could exhibit a thixotropic behavior. The apparent viscosity increased 25- and 13-folds with cholesterol concentration for drug-free and drug-load ME, respectively. It was also verified that the octanol/aqueous buffer partition coefficient ($K_{O/W}$) of doxorubicin (DOX) was pH dependent increasing abruptly above pH 6.0. It was possible to incorporate 2.24 mg/ml of DOX into ME. The incorporation of DOX in the ME systems increased the droplets size for all surfactant concentrations used in the system. The results suggest that DOX interacts with the microstructure of the ME at the studied pH increasing significantly the drug solubility. It was possible to conclude that the investigated ME can be a very promising vehicle as drug-carrier for administration of doxorubicin.

© 2006 Elsevier B.V. All rights reserved.

Keywords: Microemulsion; Soya phosphatidylcholine; Drug delivery; Doxorubicin

1. Introduction

Colloidal systems, such as microemulsions (ME) have been investigated for drug delivery and targeting, since these systems can incorporate drug compounds modifying bioavailability [1,2] and stability [3–8] and reducing side effects [9,10]. These dispersions can be defined as a mixture of at least two immiscible liquid components stabilized by surfactant compounds, which are adsorbed at oil–water interface hindering the droplet coalescence due the favorable thermodynamic [11]. ME's are frequently used for administration of lipophilic drugs usually dissolved in the oil phase of the O/W ME [12]. Due to its biocompatibility and the long-term stability ME with internal phase diameter of submicron order can be used for intravenous admin-

istration (I.V.) [13,14]. It has been described that I.V. administration of ME with droplet size in the range of 100–200 nm are largely captured by blood cells in the liver [15–18]. Because of the pharmaceutical advantages ME has been object of intensive investigations with regard to drug release [19]. In fact, depending on the composition different microstructures that can be formed, such as O/W and W/O ME and, bicontinuous structures [20–22], which can strongly affect the release of drugs [23–25]. In order to investigate the ability of ME vehicles as a drug delivery system, it is important to characterize the microstructure of ME for empty and drug-loaded. Many techniques such as light scattering and rheological studies associated to viscosity have been used to obtain suitable information about the properties of these systems [26–29].

Doxorubicin (DOX), 10-(4-amino-5-hydroxy-6-methyl-tetrahydropyran-2-yl)oxy-6,8,11-trihydroxy-8-(2-hydroxyacetyl)-1-methoxy-7,8,9,10-tetrahydrotetracene 5,12-dione (CAS

* Corresponding author. Tel.: +55 16 3301 6974; fax: +55 16 3322 0073.
E-mail address: oliveiag@fcar.unesp.br (A.G. Oliveira).

23214-92-8), is a widely used antitumoral compound. Because cell membranes are permeable to the lipid soluble anthracycline molecules with an unprotonated sugar amino group like Doxorubicin with pK_a value about 8.2 [30,31], these compounds have direct access to intracellular target sites in all cell types including tumor cells [32]. Thus, the clinical use of doxorubicin as antitumor agent has several limiting complications related to cell kill in normal tissues such as the bone marrow and intestinal epithelium. Moreover, the drug produce also related serious cardiotoxic effects as acute cardiac injury and chronic congestive cardiac failure [33–36]. It was described in the literature that the encapsulation of the chemotherapy agents within colloidal systems usually improves drug efficiency and leads to decrease of the toxicity because the carrier exit the blood circulation in tissues where capillary junctions have been disrupted and are not tightly bound, i.e. tumor growth areas [37].

Thus, it is of obvious relevance studies providing further data supporting the advantages of the delivery systems commonly used for antitumoral drugs. A number of drugs have now been successfully encapsulated in liposomes, and microemulsions [23,38–40], and in most cases appears to improve therapeutic efficacy and largely decreasing toxicity [41–43]. For DOX and others antitumoral drugs the decrease of toxicity is an important goal to improve therapeutics.

In this work, ME stabilized by the mixture phosphatidylcholine/hydrophilic surfactant was studied. The obtained systems were characterized in a pseudo-ternary phase diagram. The diameter distribution was analyzed in relation to proportion of the surfactant used and ME composition. Rheological profile was determined by controlled-stress rheological analysis. The variation of the droplet diameter, and rheological properties was studied in the presence and absence of DOX incorporated into ME.

2. Materials and methods

2.1. Material

Soya phosphatidylcholine (SPC) (Epikuron™ 200) was purchased from Degussa Texturants Systems Deutschland GmbH & Co. (Hamburg, Germany); cholesterol (CHO), sodium oleate (SO) and 1-octanol (Sigma Chemical Co, St Louis, MO, USA); tris (hydroxymethyl)amino methane (Merck, Darmstadt, F.R. Germany); doxorubicin (Adriamycin™ RD); polyoxyethylenglycerol trihydroxystearate 40 (EU) (Eumulgin® HRE 40). Water was prepared using a Milli Q Plus water purification system

(Millipore) and its resistivity was 18.2 M Ω -cm. All other solvents and chemicals were analytical grade.

2.2. Microemulsion preparation

2.2.1. Pseudo-ternary phase diagram

Previous studies with initial ME formulations containing CHO (3%) as oil phase, Tris-HCl buffer pH 7.2 as aqueous phase (80%) and surfactant mixture EU/SPC/SO (17%) were used to obtain the better hydrophilic-lipophilic balance (HLB) value for the stabilization of the clear ME system. The HLB value describes the simultaneous attraction of the surfactant mixture for the oil and aqueous phases and when is similar to required HLB of the oil phase of the ME system provides the minimum energy condition so that for ME formation. The composition of the surfactant system EU/SPC/SO was established in order to obtain the HLB values in the range of 9.88–16.23 as described in Table 1. The HLB value that provided the clearest system was used to obtain the pseudo-ternary phase diagram.

For this, to suitable amounts of SPC a weight of EU and SO were added in order to obtain the HLB 12. To the semisolid mixture SPC/EU/SO (S), CHO (O) was added. For obtaining the phase diagram adequate S/O weight ratios were used in the range from 1:9 to 9:1, respectively. To the constantly stirred semisolid mixture (1.0 g), containing S and O, the aqueous phase (W) was slowly added with a precision burette. The transitions from semisolid mixture to optically clear microemulsion, clear microemulsion to translucent dispersion or separate phase were sharp and reproducible with 0.05 ml of W. The titrations were carried out in a controlled temperature room at 25 ± 0.1 °C. ME's were prepared 24 h before the experiments and maintained at 25 ± 0.1 °C to complete the equilibrium of the system. For the phase diagram of the DOX-load ME the DOX was added to the mixture of S/O before addition of the aqueous phase and the procedure followed as described behind for DOX-free ME.

2.2.2. Preparation of DOX-load ME

Selected weights of EU and SO were added to SPC. To the semisolid mixture EU/SO/SPC (14%), CHO was added (6%). To the constantly stirred mixture containing the surfactant and oil phase the aqueous phase (80%, w/w) was slowly added. This addition sequence enabled the dissolution of the surfactant with gentle stirring. The mixture was left for 10 min in thermostatic chamber at 25 ± 0.1 °C. The appropriated amounts of DOX were dissolved directly in the liquid microemulsion (LME) previously prepared. The formulations used in this work are showed in Fig. 1(a and b) and described in Table 2.

Table 1
Surfactant mixtures used to establish the required HLB value for ME systems

Compound (%)	HLB values								
	9.88	10.31	10.80	11.37	12.02	12.80	13.72	14.84	16.23
SPC	47.76	45.23	42.34	39.02	35.16	30.61	25.19	18.60	10.42
EU	47.76	45.23	42.34	39.02	35.16	30.61	25.19	18.60	10.42
SO	4.48	9.54	15.32	21.96	29.68	38.78	49.62	62.80	79.16

55

T.P. Formariz et al. / Colloids and Surfaces B: Biointerfaces 51 (2006) 54–61

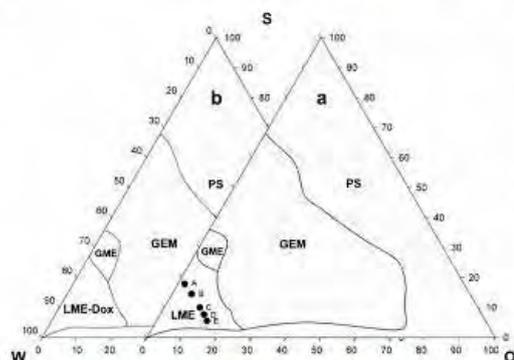


Fig. 1. Pseudo-ternary phase diagram for the system containing, SPC/EU/SO (S), CHO (O) and aqueous buffer (W). Key: (a) DOX-unload ME; (b) DOX-load ME; (LME) liquid microemulsion; (GME) gel microemulsion; (GEM) gel emulsion; (LME-Dox) DOX-load liquid microemulsion; (PS) phase separation; (●) specific compositions of the studied ME's, 25 °C.

2.3. Microemulsion characterization

2.3.1. Photon correlation spectroscopy

The particle size analysis was carried out using a photon correlation spectroscopy apparatus (Brookhaven Instruments Corporation, EMI 9863 model) with laser source He–Ne 10 mW, 532 nm-HUGHES, self-correlator, 64 channels). Before analysis the samples were diluted with buffer Tris–HCl 0.01M pH 7.2 and filtered (0.22 µm). The size measurements were carried out at fixed angle of 90°. The correlator was operated in parallel mode and the cumulant method of analysis was used to calculate the mean sample size according to the intensity of scattered light (Z —average diameter). The results are the mean and standard deviation (S.D.) of at least 10 measurements of the samples. The measurements were performed at 25 ± 0.2 °C.

2.3.2. Rheological measurements

The rheological properties of drug-load and drug-unloaded ME were determined using a controlled-stress Carrimed CSL-100 rheometer (TA instruments) with cone-plate geometry. The cone-plate geometry is a 2° stainless steel cone with a 4 cm diameter and a gap of 55 µm between the cone and plate. The experiments were performed with shear rate ($\dot{\gamma}$) in the range of 0–100 s⁻¹. The used shear rate regions were selected due to the resisting abilities against the applied stresses. The rheological measurements were performed for both, up- and down-curves. The data of the shear cycle were fitted to power-law model using the Rheology Solutions Software (version Data V1.1.7,

Table 2
Percent composition (w/w) of the microemulsions formulations

Component	ME A	ME B	ME C	ME D	ME E
Surfactant (S)	17	14	10	8	5
Oil phase (O)	3	6	10	12	15
Aqueous phase (W)	80	80	80	80	80

See Fig. 1 for phase diagram illustration.

TA Instruments). The apparent viscosity (η_{app}) was determined at shear rate of 60 s⁻¹. All rheological determinations were carried out in triplicate for all samples and at 25.0 ± 0.2 °C.

2.3.3. Partition coefficients

The partition coefficient of doxorubicin was determined from 5 ml of 20 mg/ml DOX buffered solutions at the pH's 4.8, 5.8, 6.8, 7.2, 8, 8.8 and 9.8. 5 ml of 1-octanol were added to DOX solutions and the mixture was maintained constantly stirred for 30 min. After, the samples were transferred to a separatory funnel and kept at rest for 20 min. The aqueous phase was separated and centrifuged at 3800 rpm for 15 min (Sorvall TC Centrifuge). The samples were prepared and analyzed in triplicate.

2.3.4. Maximum incorporation of DOX into microemulsion

Microemulsions containing S (14%), O (6%) and W (80%), were prepared in triplicate. Five milliliters of ME were transferred to sonication tube, excess of DOX was added, and the system was submitted to ultra-sound for 5 min. After sonication, the microemulsions were centrifuged at 30,000 rpm for 30 min to remove the drug excess. Supernatant was recovered and carefully filtered using a 0.45 µm membrane. The filtrate was diluted and dissolved in methanol for the quantitative analysis of the DOX by HPLC.

2.3.5. Quantitative analysis of doxorubicin

Doxorubicin was analyzed by HPLC using a Shimadzu instrument with a pump model LC-9A; UV–vis detector model SPD-6AV; temperature controlled column oven model CTO-6A; integrator model C-R6A; system controller model SCL-6B) and rheodyne injector with 10 µl loop. Lichrospher® 100 RP-18 column 25 cm long × 4.6 mm with 5 µm particle size. The used mobile phase was the mixture of phosphate buffer 0.01 M pH 2.96 and methanol (40:60, w/w). Flow rate of 1 ml/min, column temperature 30 °C, and UV–vis detector at 485 nm.

3. Results and discussion

From initial studies with microemulsions formulations we have found that the more clear system containing CHO, EU/SPC/SO and aqueous buffer was obtained with surfactant mixture of HLB 12 that is related to SPC/EU/SO ratio about 3.5:3.5:3.0, respectively. Thus, this surfactant composition with HLB 12 was selected for the sequence of the study.

For a good characterization of the ME systems the determination of the pseudo-ternary phase diagram that describes the ideal experimental conditions in which the components must be combined to form a clear preparations is of relevance. For SPC/EU/SO stabilized microemulsions the pseudo-ternary phase diagram (Fig. 1(a)) describes the wide range of possibilities to obtain clear systems in the phase diagram regions where the O/W ME can prevail. For the system containing doxorubicin a very similar domain region for ME was obtained in the phase diagram (Fig. 1(b)).

The microemulsions formulations were selected in order to obtain oil in water systems when diluted with aqueous buffer,

Table 3
Determination of the droplet size and polydispersity of the ME by light scattering

S/O ratio	Surfactant (%)	DOX-free ME		DOX-load ME	
		Diameter \pm S.D. (nm)	PDI \pm S.D.	Diameter \pm S.D. (nm)	PDI \pm S.D.
0.333	5	167.9 \pm 1.1	0.151 \pm 0.012	215.2 \pm 2.3	0.246 \pm 0.106
0.667	8	91.3 \pm 0.6	0.189 \pm 0.009	138.0 \pm 3.2	0.233 \pm 0.057
1.000	10	94.0 \pm 0.6	0.271 \pm 0.016	141.4 \pm 2.7	0.115 \pm 0.042
2.333	14	68.6 \pm 0.7	0.234 \pm 0.013	109.4 \pm 2.2	0.277 \pm 0.076
5.667	17	62.4 \pm 0.3	0.221 \pm 0.009	96.1 \pm 1.3	0.233 \pm 0.011

Key: standard deviation (S.D.), polydispersity index (PDI).

The points (A–D) showed in the phase diagram of Fig. 1(a) represents the compositions of the formulations used in this work.

The data of the pseudo-ternary phase diagram (Fig. 1(a)) shows that it is possible to add a great volume of aqueous phase and limited volume of oil phase maintaining the thermodynamic stability of systems. Clear and translucent regions are shown in the phase diagram as ME domain system. The analysis of the regions of the phase diagram (Fig. 1(a)) shows that a distinct transition from separated phases to gel emulsions, from gel emulsion to gel microemulsions (GMEs) and liquid microemulsions could be observed. Depending on the oil phase contents it was verified that about 30% of aqueous phase was necessary to form GEM phases. Gel microemulsion system was present in small region involving aqueous phase in the range of 60–70% and the maximum of 10% of oil phase. Above 70% of aqueous phase a completely clear liquid microemulsion was obtained at low oil phase volume. However, when the oil phase proportion was increased the system became translucent indicating a probable change in the internal microstructure. In fact, light scattering experiments show that when the oil phase proportion increases together the decrease of the surfactant amount the diameter of the oil drops increases allowing the formation of the slightly translucent system.

The remainder region of the phase diagram represented by turbid system (GEM) involves the conventional emulsions of high viscosity. Furthermore, we have found that in the interest region of the phase diagram which represents O/W ME with high content of aqueous phase the incorporation of the DOX did not alter significantly the phase diagram region for liquid microemulsion LME-DOX (Fig. 1(b)). The systems remain isotropic, optically transparent and after centrifugation 30,000 rpm for 30 min no phase separation or solid sediment was observed. Thus, the stabilization of the system with SPC/EU provides conditions to reduce interfacial tension to allow the formation of clear and slightly translucent systems [44–47].

Light scattering are a routine technique to determination of the diameter of internal phase of microemulsions. The light scattering measures has been made for liquid microemulsions which was diluted with aqueous buffer in order to detect experimental errors [48].

The diameters of the oil droplets are shown in Fig. 2 and Table 3.

We have found that for DOX-load ME the diameters mean varied from 96 to 215 nm and that for DOX-unload ME from 62 to 168 nm with the surfactant concentrations. Detailed data

including the polydispersity index (PDI) are showed in Table 3. The polydispersity index was calculated by size average of the droplets divided by the number average of measured droplets. For both, DOX-free ME and DOX-load ME the PDI obtained from the light scattering analysis showed values (0.1–0.2) indicating a good size distribution of the oil droplet in the ME system. This parameter reflects directly the size homogeneity of the droplets in the total microemulsion.

The data showed to be dependent on the ratio of surfactant (S) and oil phase (O) of ME. We can verify that for both, drug-load and unload ME the diameters of the structures decrease with the S/O ratio and reaches a minimum when the surfactant proportion predominate over the oil phase (Fig. 2). In the insert of Fig. 2 is possible to observe the decrease of the oil phase diameter as a function of the surfactant concentration.

Therefore, we have found that the DOX incorporation into microemulsion modified the diameter profile of the oil internal phase of ME. For DOX-load ME the effect seems to be more pronounced in all range of surfactant concentrations. One hypothesis to explain the biggest diameters of the oil droplets when DOX was incorporated to ME system is related with the hydrophobic property of the DOX molecule in the studied pH region. Since the pK_a value of DOX was taken as 8.2, under pH 7.2 DOX is predominantly hydrophobic and the drug can be favorably partitioned into oil phase. In this condition the DOX

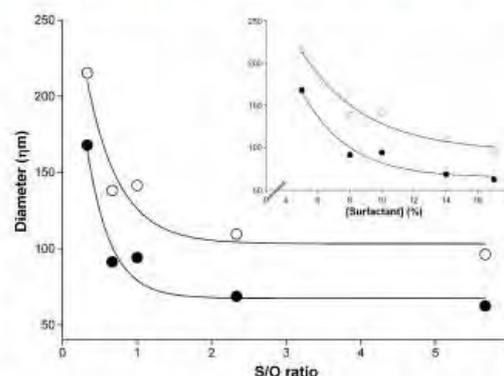


Fig. 2. Effect of the ratio of surfactant/oil phase on the diameter of ME oil droplets. Key: (○) DOX-load ME; (●) DOX-unload ME (see Table 2 for formulations details), 25 °C. The insert represents the effect of the surfactant proportion on the diameter.

58

T.P. Formariz et al. / Colloids and Surfaces B: Biointerfaces 51 (2006) 54–61

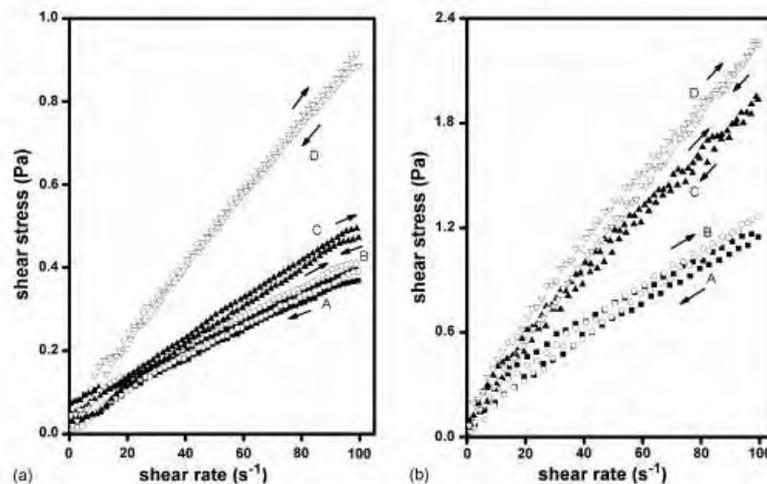


Fig. 3. Rheological behavior of ME and EM stabilized with EU/SPC/SO. (See Table 2 for formulations details.) Key: (a) DOX-free ME; (b) DOX-load ME.

can be considered as an additional fraction of oil phase added to ME system increasing the droplets volume. In addition, since a small fraction of DOX is ionized at the experimental conditions the amphiphilic property of the drug promotes the incorporation of the DOX molecules as a spacer into the surfactant monolayer at oil–water interface leading to droplet size increase. Thus, these phenomena can explain the parallel shift between DOX-free and DOX-loaded ME data observed in Fig. 2.

Fig. 3 shows the rheological profile of the samples relating the shear stress (τ) and the shear rate ($\dot{\gamma}$) relationships.

The flow curves revealed that the most ME systems showed a non linear relationship between the shear stress and shear rate exhibiting a non-Newtonian flux characteristic. In this case the viscosity can be termed “apparent viscosity” and is dependent on the shear rate, pressure, temperature and time [49]. Because these properties the systems behave as a pseudoplastic and a power-law model can be used to describe the flow characteristics of the ME's. Thus, the flow behavior can be described by the expression [50]:

$$\tau = k(\dot{\gamma})^n \quad (1)$$

where k is a constant parameter related to the viscosity (consistency index) and n is the flow behavior index. In this model $n > 1$ represents a dilatant fluid; $n < 1$ represents a pseudoplastic fluid and Newtonian fluids have n value of unity.

Table 4
Effect of the ME compositions on the flow behavior and consistency

DOX-free ME	n	k (Pa s)	r^2	DOX-load ME	n	k (Pa s)	r^2
A	0.67	0.01	0.947	A	0.58	0.01	0.992
B	0.69	0.02	0.974	B	0.72	0.03	0.997
C	0.82	0.02	0.980	C	0.73	0.05	0.998
D	0.85	0.03	0.988	D	0.75	0.07	0.998

See Table 1 and Fig. 1 for formulations details.

Table 4 gives the values of k and n for both, DOX-load and DOX-free ME. In Table 4 r^2 represents the regression coefficient. As can be seen in Table 4, all n values obtained are less than unity, indicating that these systems behave as pseudoplastic shear-thinning fluids. This behavior is due to the orientation of droplets towards the flow caused by shearing of system.

The degree of shear-thinning could be measured through the n parameter that decreases when the pseudoplasticity increases. However, from the data of Table 4, it was found that the n value increases with the amount of the oil phase added provoking the decrease of the pseudoplastic characteristic of the systems.

The thixotropic behavior of ME on its composition was also studied. The response of the thixotropic properties of ME to stepwise changes of shear rate is showed in Fig. 3(a and b). It was found that this property could build up with addition of DOX to ME system. The results of Fig. 3(b) demonstrated that thixotropic DOX-load ME becomes more mobile with the stirring. In general, the changes in the material caused by the shearing process reduces the viscosity under the shear stress but the structure is gradually recovered when the stress is removed [51,52]. This is a desired property in pharmaceutical dispersions as ME, especially for pseudoplastic systems, because the decrease of the viscosity facilitates not only the drug administration but also the ME preparation. For the DOX-free ME's the thixotropic behavior was negligible highlighting the DOX role on the ME weak thixotropy. It is

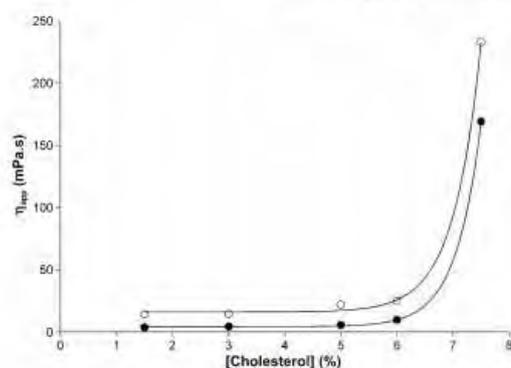


Fig. 4. Variation of the apparent viscosity with cholesterol ratio added to ME. Key: (●) DOX-free ME; (○) DOX-load ME.

known that the thixotropic property progressively breaks down on shearing and slowly rebuild at rest for a time period [53,54].

The apparent viscosity of the ME systems could be evaluated through the consistency index (k). For both, DOX-load and DOX-free ME's, the values of k varied slightly in low proportions of oil phase (Table 4). The analysis of the results of Fig. 4 showed that in fact the apparent viscosity varied slightly with the proportion of oil phase (cholesterol) up to 6%, but increased abruptly in higher concentrations.

The modification of the apparent viscosity η_{app} profile of ME discloses that the DOX incorporation leads to an increase in the η_{app} when compared with empty ME (Fig. 4). This effect can be explained since the interaction of DOX with the oil droplets provokes the formation of more voluminous microstructures which ones reflect directly in the apparent viscosity of the system. In fact, the light scattering analysis showed larger diameters for the oil drops when DOX was incorporated to ME (Fig. 2). In addition, it is well known that the increase of the oil phase leads to an enhancement of the apparent viscosity [37,54].

The variation of the apparent viscosity verified in our results can be due to the properties of the oil phase and also to the modifications achieved on the diameter of the oil droplets. For diluted ME the oil droplets are scarce and have not or have a little effect on the viscosity. But when the diameter increases or the number of droplets increases per volume unity the drop–drop interactions become predominant and then the frictional effects can lead to the viscosity increase.

The drug–vehicle interaction plays an important role on the rate of drug release. This feature can be predicted from the magnitude of the partition coefficient at particular experimental

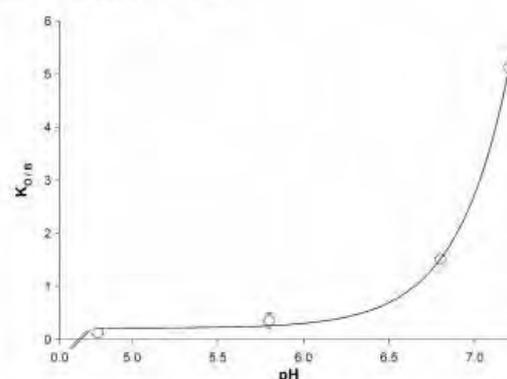


Fig. 5. Effect of pH on the values of the partition coefficients. Average \pm S.D.

condition. The results of the oil/buffer partition coefficient of doxorubicin ($K_{O/B}$) described in Table 5 and Fig. 5, show that the DOX solubility was pH dependent, since the pK_a value for a single sugar amine is about 8.2 [30,55].

The partition of the DOX in oil/water system is dependent on the hydrophobic interactions of the drug with the octanol phase. Thus, this interaction has more significant influence when the undissociated amino group of DOX predominates in the medium.

Since the pK_a value of DOX was taken as 8.2, at the pH's values in which the undissociated drug fraction starts to exist, the DOX fraction dissolved in the oil phase increases leading to the increase in the partition coefficient value. The results of Fig. 5 shows that the solubility of DOX decreases with the pH of the aqueous phase favoring the partition of the neutral species of the drug in the oil phase, increasing the $K_{O/B}$ values with the pH.

At pH 7.2 the partition coefficient of DOX was around 5.13 (Table 5). In this experimental condition the analytical DOX measured in the 1-octanol phase was about 84% of the total added drug. We have found that at pH 8 the DOX dissolved in the aqueous phase was worthless and all added drug practically remain in the oil phase. However, at pH 4.8 in which the dissociated DOX species exist it was expected that most drug remained in the aqueous phase.

The results of Table 5 show that in this experimental condition just 89% of DOX remained in the aqueous phase. These results demonstrate the strong contribution of the hydrophobic region of DOX molecule in the solubilization of the drug in the lipophilic solvent. This phenomenon can explain the favorable solubilization of DOX in the oil phase of ME through hydropho-

Table 5
Effect of pH on the doxorubicin partition coefficient ($K_{O/B}$) value

pH	Analytical DOX in aqueous phase (%)	DOX in octanol phase (%)	Partition coefficient ($K_{O/B}$) \pm S.D.	Log of partition coefficient ($K_{O/B}$)
4.8	89.1	10.9	0.12 \pm 0.06	−0.91
5.8	73.8	26.2	0.36 \pm 0.14	−0.45
6.8	39.8	60.2	1.51 \pm 0.06	0.18
7.2	16.3	83.7	5.13 \pm 0.37	0.71

bic effect. In fact, the results of Fig. 5 showed that this interaction has more significant influence when the undissociated specie of DOX increases in the medium.

For the maximum incorporation of DOX into ME system we can verify that the diameter of ME oil droplets decrease rapidly with the S/O ratio and at around the ratio 2:1 (14% of surfactant, insert Fig. 2) the diameter reaches practically a minimum showing droplets size adequate for DOX's administration by several routes. The experimental condition established near this S/O ratio corresponds to 2.3:1, represented by the system containing surfactant 14%, oil phase 6% and aqueous phase 80%. It was also verified that even about 6% of CHO the apparent viscosity was practically independent on the internal phase proportion showing low viscosity (Fig. 4). Thus, since this ME system also exhibited great physical stability we could to rationalize the most appropriate ME formulation to incorporate the DOX. In this experimental conditions we have found that the maximum incorporation of DOX into ME system was about 2.24 mg of DOX per milliliter of ME. This ratio is a very high concentration than the dose required for therapeutic effect. Thus, ME systems provides a very good condition for in vivo administration of DOX.

4. Conclusions

The results of this work show that it is possible to obtain oil in water microemulsion stabilized by mixed surfactant soya phosphatidylcholine/eumulgin/sodium oleate. The pseudo-ternary phase diagram demonstrate that a clear systems like oil in water microemulsion exists in a defined region of high water contents and that the increase in the oil phase with decrease of the water phase proportions leads to obtaining of a gel emulsion and microemulsions. The size of the oil phase of ME decreased significantly with the ratio of surfactant/oil phase reaching a minimum with high surfactant proportions. The rheological study of the systems revealed a pseudoplastic shear-thinning fluids behavior for all studied ME. A weak thixotropic property for DOX-load ME and a negligible effect for DOX-free ME were obtained. The partition coefficient of DOX was pH dependent and increases abruptly after pH 6.0 justifying the favorably incorporation of the DOX in the oil phase of ME in the experimental conditions of this work. The concentration of maximum incorporation of DOX in the ME system was very greater than the DOX necessary dose for obtaining therapeutic effect. It was possible to conclude that the investigated ME system can be a promising vehicle as drug-carrier for administration of doxorubicin.

Acknowledgements

The authors wish to thank FAPESP and CNPq for the financial support.

References

- [1] D.N. Reddy, N. Udupa, *Drug Dev. Ind. Pharm.* 19 (1993) 843.
- [2] P.P. Constantinides, G. Welzel, H. Ellens, P.L. Smith, S. Sturgis, S.H. Yiv, A.B. Owen, *Pharm. Res.* 13 (1996) 210.
- [3] A.T. Florence, D. Attwood, *Physicochemical Principles of Pharmacy*, third ed., Macmillan Press, Hampshire, 1998.
- [4] A.G. Oliveira, I.M. Cuccovia, H. Chaimovich, *J. Pharm. Sci.* 79 (1990) 37.
- [5] A.G. Oliveira, M. Nothenberg, H. Cuccovia, H. Chaimovich, *J. Phys. Org. Chem.* 4 (1991) 19.
- [6] A.G. Oliveira, H. Chaimovich, *J. Pharm. Pharmacol.* 45 (1992) 850.
- [7] L.B. Lopes, M.V. Scarpa, G.V.J. Silva, D.C. Rodrigues, C.V. Santilli, A.G. Oliveira, *Colloids Surf. B* 39 (2004) 151.
- [8] S.M.B. Souza, N.O. Oliveira Jr., M.V. Scarpa, A.G. Oliveira, *Colloids Surf. B* 36 (2004) 13.
- [9] E.M. Lima, L.B. Lopes, M.V. Scarpa, A.G. Oliveira, *Rev. Ciênc. Farm. São Paulo* 22 (2001) 281.
- [10] E.M. Lima, A.G. Oliveira, *Drug Dev. Ind. Pharm.* 28 (2002) 673.
- [11] F. Nielloud, G. Marti-Mestres, *Pharmaceutical Emulsions and Suspensions*, Marcel Dekker, New York, 2000.
- [12] B.D. Tarr, T.G. Sambandan, S.H. Yalkowsky, *Pharm. Res.* 4 (1987) 165.
- [13] R.J. Prankerd, V.J. Stell, *J. Parent. Sci. Tech.* 44 (1990) 149.
- [14] L.F. Uchegbu, *Int. J. Pharm.* 162 (1998) 27.
- [15] M.J. Lee, M.H. Lee, C.K. Shin, *Int. J. Pharm.* 113 (1995) 187.
- [16] F. Liu, D. Liu, *Pharm. Res.* 12 (1995) 1064.
- [17] T.P. Formariz, B.T. Wanczinski, A.A. Silva-Junior, M.V. Scarpa, A.G. Oliveira, *Infarma* 16 (2004) 57.
- [18] Y.K. Song, D.X. Liu, K. Maruyama, T. Takizawa, *PDA J. Pharm. Sci. Tech.* 50 (1996) 377.
- [19] M.J. Lawrence, D.G. Rees, *Adv. Drug Del. Rev.* 45 (2000) 121.
- [20] M. Bourrel, R.S. Schechter (Eds.), *Microemulsions and Related Systems*, Marcel Dekker, New York, 1988.
- [21] D. Attwood, A.T. Florence, *Surfactants System: Their Chemistry, Pharmacy and Biology*, Chapman and Hal, New York, 1983.
- [22] K.L. Mittal, B. Lindman (Eds.), *Surfactants in Solution*, Plenum, New York, 1984.
- [23] M.A. Correa, M.V. Scarpa, M.C. Franzini, A.G. Oliveira, *Colloids Surf. B* 43 (2005) 114.
- [24] M.E. Dalmora, A.G. Oliveira, *Int. J. Pharm.* 184 (1999) 157.
- [25] M.E. Dalmora, S.L. Dalmora, A.G. Oliveira, *Int. J. Pharm.* 222 (2001) 45.
- [26] A.G. Oliveira, M.V. Scarpa, M.A. Correa, L.F.R. Cera, T.P. Formariz, *Química Nova* 27 (2004) 138.
- [27] R. Abofazeli, D. Barlow, M.J. Lawrence, *AAPS Pharm. Sci.* 2 (2000) U188.
- [28] J. Eastoe, R.K. Reenan, *J. Chem. Soc. Faraday Trans.* 90 (1994) 487.
- [29] C.M. Chen, G.G. Warr, *J. Phys. Chem.* 96 (1992) 9492.
- [30] N. Raghunand, B.P. Mahoney, R.J. Gillies, *Biochem. Pharmacol.* 66 (2003) 1229.
- [31] I. Facchetti, M. Grandi, P. Cucchi, C. Geroni, S. Penco, A. Vigevari, *Anti-Cancer Drug Des.* 6 (1991) 385.
- [32] J.M. Siegfried, T.G. Burke, T.R. Tritton, *Biochem. Pharmacol.* 34 (1985) 593.
- [33] L.E. Olson, D. Bedja, S.J. Alvey, A.J. Cardounel, K.L. Gabrielson, R.H. Reeves, *Cancer Res.* 63 (2003) 6602.
- [34] S. Mitra, U. Gaur, P.C. Ghosh, N.A. Maitra, *J. Control. Release* 74 (2001) 323.
- [35] M.G. Mostafa, T. Mima, S.T. Onishi, K. Mori, *Planta Med.* 66 (2000) 148.
- [36] L. Lenaz, J.A. Page, *Cancer Treat. Rev.* 3 (1976) 111.
- [37] J.L. Salager, in: F. Nielloud, G. Marti-Mestres (Eds.), *Pharmaceutical Emulsions and Suspensions*, Marcel Dekker, New York, 2000 (Chapter 3).
- [38] M.E. Dalmora, A.G. Oliveira, *Int. J. Pharm.* 184 (1999) 157.
- [39] I. Ahmad, M. Longenecker, J. Samuel, T.M. Allen, *Cancer Res.* 53 (1993) 1488.
- [40] T.M. Allen, *TI/Pharmacol. Sci.* 15 (1994) 215.
- [41] D.G. Rodrigues, C.C. Covolan, S.T. Coradi, R. Barboza, R.C. Maranhão, *J. Pharm. Pharmacol.* 54 (2002) 772.
- [42] S. Mitra, U. Gaur, P.C. Ghosh, N.A. Maitra, *J. Control. Release* 74 (2001) 323.

- [43] R.C. Maranhão, S.R. Graziani, N. Yamaguchi, R.F. Melo, M.C. Latriilha, D.G. Rodrigues, R.D. Couto, S. Schreier, A.C. Buzaid, *Cancer Chemother. Pharmacol.* 49 (2002) 498.
- [44] S. Avramiotis, V. Beckiari, P. Lianos, A. Xenakis, *J. Colloid Interface Sci.* 195 (1997) 331.
- [45] H.N. Bhargava, A. Narurkar, L.M. Lieb, *Pharm. Tech.* 3 (1987) 54.
- [46] W.K. Kegel, J.T.G. Overbeek, H.N.W. Lekkerkerker, Thermodynamics of microemulsions I, in: P. Kumar, K.L. Mittal (Eds.), *Handbook of Microemulsion Science and Technology*, Dekker, Basel, New York, 1999.
- [47] B. Lindman, S.E. Friberg, Microemulsions—a historical overview, in: P. Kumar, K.L. Mittal (Eds.), *Handbook of Microemulsion Science and Technology*, Dekker, Basel, New York, 1999.
- [48] D. Orthaber, O. Glatter, *Chem. Phys. Lipids* 107 (2000) 189.
- [49] H.V. Atkinson, *Prog. Mater. Sci.* 50 (2005) 341.
- [50] Z.Q. Chen, Z.G. Dai, *Colloid Chemistry*, Higher Education Press, Beijing, China, 1984.
- [51] A. Martin, *Physical Pharmacy*, fourth ed., Lea & Febiger, Philadelphia, 1993.
- [52] H.A. Barnes, Thixotropy—a review, *J. Non-Newton Fluid Mech.* 70 (1997) 1.
- [53] H.A. Barnes, Rheology of emulsions—a review, *Colloids Surf. A* 91 (1994) 89.
- [54] M.T. Ghannam, M.N. Esmail, *J. Appl. Polym. Sci.* 64 (1997) 289.
- [55] L. Djordjevic, M. Primorac, M. Stupar, D. Krajisnik, *Int. J. Pharm.* 271 (2004) 11.

Available online at www.sciencedirect.com

Colloids and Surfaces B: Biointerfaces 60 (2007) 28–35

www.elsevier.com/locate/colsurfb

Relationship between structural features and *in vitro* release of doxorubicin from biocompatible anionic microemulsion

T.P. Formariz^a, L.A. Chiavacci^a, V.H.V. Sarmiento^b, C.V. Santilli^b,
E.S. Tabosa do Egito^c, A.G. Oliveira^{a,*}

^a Departamento de Fármacos e Medicamentos, Faculdade de Ciências Farmacêuticas-UNESP, Rodovia Araraquara-Jatá km 01, 14801-902 Araraquara, SP, Brazil

^b Departamento de Físico-Química, Instituto de Química-UNESP, Rua Francisco Define s/n, 14800-900 Araraquara, SP, Brazil

^c Departamento de Farmácia, Centro de Ciências da Saúde-UFRN, Rua Gal. Gustavo Cordeiro de Farias s/n, 59010-180 Natal, RN, Brazil

Received 2 February 2007; received in revised form 18 May 2007; accepted 21 May 2007
Available online 2 June 2007

Abstract

In this work structural features of anionic microemulsions, containing the pharmaceutical biocompatible components soya phosphatidylcholine (SPC), emulgin HRE 40 (EU) and sodium oleate (SO) as surfactant, cholesterol (CHO) as oil phase and aqueous buffer were studied. Microemulsions were formulated with and without the antitumor drug doxorubicin (DOX). The various microstructures characterized in the pseudo-ternary phase diagram were analyzed by polarized light microscopy, small-angle X-ray scattering (SAXS) and X-ray diffraction (XRD) as well as by their ability to incorporate and release DOX. The experimental results demonstrated a correlation between the composition, the structural features and drug delivery. It was found that at higher cholesterol contents, the crystallization of CHO polymorph phases changed the mobility of DOX molecules. Droplets were formed with short-range spatial correlation from a microemulsion (ME) with a low surfactant:oil ratio. More ordered structures with lamellar arrangements formed by the increasing of the CHO proportions in the formulation may be due to CHO crystallization. The *in vitro* release of DOX showed that the presence of a high content of crystalline CHO prolongs the release of DOX from ME. The retention of DOX in the internal oil phase of the ME may modulate the drug release for a prolonged time. These results clearly demonstrate the potential of ME as a drug-delivery system.

© 2007 Elsevier B.V. All rights reserved.

Keywords: Anionic microemulsion; Mesophases; Drug delivery; Doxorubicin; SAXD; XRD

1. Introduction

Designing new vehicles for old drugs is an important field of pharmaceutical research, since in many treatments the severe collateral effects of a drug reduce greatly the use of therapeutically compounds. Strategies to decrease toxicity and increase the pharmacological effect of drugs are highly relevant. A number of factors as the poor drug absorption, metabolism and fast elimination, nonspecific distribution of the drug in all body tissues, coupled to its high toxicity (i.e. antitumor drugs), fluctuations in the drug plasma level and unpredictable bioavailability must be prevented [1,2].

The development of new formulations for drug delivery, in particular lyotropic liquid crystals and microemulsions, prin-

cipally for parenteral administration [3,4], has attracted the attention of many researchers, owing to their thermodynamic stability, potentially high solubility, biocompatibility and high capacity to improve the bioavailability of drugs [5]. These aggregates have distinct hydrophilic and lipophilic domains, allowing the dissolution of both water-soluble and water-insoluble drugs [6–8].

Depending on the structure, composition, and nature of these aggregates, several isotropic and anisotropic liquid-crystalline phases with distinct microstructures, such as cubic, hexagonal and lamellar phases can be formed [6,8,9].

Modifications in the composition of the systems can promote changes in structural features and consequently in the mechanical behavior and may constrain the extent of mobility and direction of movement of molecules dissolved in such systems. It is known that less ordered microemulsion systems usually have reduced viscosity, while the more ordered hexagonal and

* Corresponding author. Tel.: +55 16 3301 6974; fax: +55 16 3322 0073.
E-mail address: oliveia@cfar.unesp.br (A.G. Oliveira).

cubic phases show the elastic properties of solids [5,6,10,11]. As the mobility of molecules is higher in liquid than in solid systems, such structural modifications can raise the rate and the profile of drug delivery [5,8–10].

Doxorubicin (DOX), 10-(4-amino-5-hydroxy-6-methyl-tetrahydropyran-2-yl)oxy-6,8,11-trihydroxy-8-(2-hydroxyacetyl)-1-methoxy-7,8,9,10-tetrahydrotetracene 5,12-dione (CAS 23214-92-8), a well-known anticancer drug, is an anthracycline antibiotic, with a broad spectrum of antitumor activity, including against various human and animal solid tumors [12]. DOX is a cytotoxic drug that becomes intercalated in the stack of paired bases in DNA. Cellular resistance mechanisms reduce the concentration of DNA-binding drugs; they include membrane transport mechanisms, such as the P170 glycoprotein or others, and intracellular vesicular trapping [13,14]. However, potential therapeutic application has been severely restricted by the dose-limited cardiotoxicity and myelosuppression [13–15]. Thus, research aimed at improving systems that provide conditions for the secure administration of toxic antitumor drugs is highly relevant.

A number of drugs have now been successfully encapsulated in liposomes and microemulsions [16–19], and in most cases these appear to improve therapeutic efficacy, while significantly decreasing toxicity [2,20]. For DOX and other antitumor drugs, reduction of toxicity is a crucial step towards improving therapy.

In this study, microemulsions (ME) containing pharmaceutical biocompatible components were prepared with and without doxorubicin. The various microstructures were characterized in the pseudo-ternary phase diagram and analyzed by polarized light microscopy, small-angle X-ray scattering (SAXS) and X-ray diffraction (XRD) as well as by their ability to incorporate and release the doxorubicin. The main aim was to understand the microstructures of the systems produced, to explain the delivery behavior of DOX from ME.

2. Materials and methods

2.1. Materials

Soya phosphatidylcholine (SPC) (EpikuronTM 200) was purchased from Degussa Texturants Systems Deutschland GmbH & Co. (Hamburg, Germany); cholesterol (CHO), cellulose acetate membrane (M_w 12,000–14,000), sodium oleate (SO) (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA); Tris (hydroxymethyl)amino methane (Merek, Darmstadt, F.R. Germany); doxorubicin hydrochloride (DOX) (AdriamycinTM RD); polyoxyethyleneglycerol trihydroxystearate 40 (Eumulgin[®] HRE 40) (EU). Water was purified in a Milli Q Plus purification system (Millipore) and its resistivity was 18.2 M Ω cm. All other solvents and chemicals were analytical grade.

2.2. Microemulsion preparation

2.2.1. Pseudo-ternary phase diagram

The proportions SPC:EU:SO which formed the surfactant mixture (S) was previously established as 35:35:30 (w/w), with a hydrophilic–lipophilic balance (HLB) of 12. This HLB

value provided the clearest system to obtain the pseudo-ternary phase diagram [11]. CHO (O) was added the semisolid mixture SPC/EU/SO (S), in suitable ratios from 1:9 to 9:1 (w/w), to obtain the phase diagram. DOX was added to the S/O mixture. To the constantly stirred semisolid mixture (1.0 g), containing S and O, the aqueous phase (W) was slowly added with a precision burette. The transitions from semisolid mixture to optically clear microemulsion, clear microemulsion to translucent colloidal suspension or phase separation were sharp and reproducible to within 0.05 mL of W. The titrations were carried out in a controlled-temperature room at 25 ± 0.1 °C. MEs were prepared 24 h before the experiments and maintained at 25 ± 0.1 °C to allow the system to reach complete equilibrium.

2.2.2. Preparation of DOX-loaded ME

CHO was added the semisolid mixture of S. To the surfactant and oil phase, the aqueous phase (80%, w/w) was added and the mixture stirred for 10 min, after which it was left for 24 h at 25 ± 0.1 °C, to reach total equilibrium. The samples were then centrifuged at 10,000 rpm for 15 min, to eliminate the titanium residues that may be released from the sonicator tip. The appropriate amounts (2 mg/mL) of DOX were dissolved directly in previously prepared the microemulsions. The formulations tested are shown in Table 1.

2.3. Microemulsion characterization

2.3.1. Polarized light microscopy

Samples were prepared by placing a drop of ME between a cover slip and a glass slide and then examined under polarized light. An Optical Leica Microscope equipped with a digital camera was used to analyze various fields of each sample at room temperature. The isotropic or anisotropic behavior of the samples was observed. Pictures were taken at a magnification 20,000 \times .

2.3.2. SAXS measurements and data analysis

The nanometric structure of the phase was studied by small-angle X-ray scattering (SAXS) measurements. Data was collected at the Synchrotron SAXS beam line of the National Laboratory of Synchrotron Light (LNLS, Campinas, Brazil), equipped with an asymmetrically cut and bent Si (1 1 1) monochromator ($\lambda = 1.608$ Å) that yields a horizontally focused beam. A vertical position-sensitive X-ray detector and a multichannel analyzer were used to record the SAXS intensity, $I(q)$, as a function of the modulus of the scattering vector q , $q = (4\pi/\lambda)\sin(\epsilon/2)$, ϵ being the scattering angle. The parasitic scattering produced by slits was subtracted from the total scattering intensity. Both scattering intensities were recorded in relative units but, for a quantita-

Table 1
Percent composition of the microemulsion formulations

ME composition (w/w)	ME A	ME B	ME C	ME D	ME E
SPC/EU/SO (35:35:30) (S)	18.5	17.0	15.0	14.0	12.5
CHO (O)	1.5	3.0	5.0	6.0	7.5
Aqueous phase (W)	80.0	80.0	80.0	80.0	80.0

tive comparison, they were normalized to the same experimental conditions. Since the incident X-ray beam has a point-like cross-section in the detection plane and the width of the detector slit was small, no mathematical desmearing of the scattering curves was done.

For systems formed by an association of surfactant, water and oil phases it is well established that at low surfactant concentrations (lower than the critical micellar concentration CMC) the SAXS intensity is similar to that observed for dilute and monodispersed particles. At surfactant concentrations higher than the CMC, interactions between surfactant molecules occur to different degrees and in various arrangements. The scattering patterns may be similar to that observed for a set of uncorrelated particles dispersed in a homogeneous matrix, at low q produced by an isotropic system, and can be described by the Guinier law, which applies strictly to the low- q limit but may be used as a good approximation over a fairly wide q range, depending on the shape and size distribution of the scattering particles. Assuming that this law actually holds for a given dilute set of particles over a rather wide range of q , the scattering intensity that would be observed if the same particles were spatially correlated is given by [21]:

$$I(q) = G \times e^{-R_g^2 q^2/3} \times S(q) \quad (1)$$

where $G = NV^2(\rho_p - \rho_m)^2$, ρ_p and ρ_m being the electron densities of the particles and the matrix, respectively, V the particle volume, and N is the number of particles in the irradiated sample. R_g is the average of the radius of gyration of the particles and $S(q)$ is the structure function accounting for the spatial correlation of the particles.

For the cases of systems of correlated particles, such as micelles, microemulsions and liquid-crystalline phases, the SAXS curves present a wide band or very wide peaks associated with the short-range 3D spatial correlation of the micelles or microemulsion particles [6,8,9]. For these cases, a simple structure function proposed in [22], to model the scattering intensity produced by a dense set of spherical particles, can be used:

$$S(q) = \frac{1}{1 + k\theta} \quad (2)$$

k being a packing factor equal to $8V/V_0$ where V is the average hard-core volume and V_0 is the average volume available to each sphere. The form factor θ is related to the average interparticle distance d and given by:

$$\theta = \frac{3[\sin(qd) - qd \cos(qd)]}{(qd)^3} \quad (3)$$

Eq. (2) actually applies to a set of particles with spherical shape but it can be used as a quite good approximation for other nearly isodiametric particles with a narrow size distribution.

At medium to high surfactant concentrations, the systems are more structured than those at low concentrations. The surfactant molecules aggregate and form small crystalline domains randomly oriented, with lattices exhibiting 1D, 2D or 3D long-range correlations and lattice parameters of the order of tens or hundreds of Angstrom (\AA). The intensity $I(q)$ produced the

scattering from these materials exhibits sharp maxima (or Bragg peaks) for specific values of the modulus of the scattering vector q and the scattering technique can now be named SAXD. If the SAXD patterns contain several peaks, their positions on the q -axis reveal the type of crystal lattice of the structures and permit their lattice parameters to be calculated [23].

2.3.3. X-ray diffraction

The crystalline structure of the samples was analyzed by powder X-ray diffraction (XRD). The data were collected on a Siemens D-500 diffractometer (Cu $K\alpha$ radiation, $\lambda = 1.541 \text{ \AA}$) with a curved graphite monochromator, by using the step counting method (step 0.05° and time 0.1 s) in a 2θ range between 4° and 70° .

2.3.4. In vitro drug release

To evaluate the profile of release of the doxorubicin when incorporated into microemulsion the apparatus described in The USP Pharmacopeia [24] was used, modified for the cuvette of the spectrophotometer [25]. The dissolution apparatus, adapted for liquid pharmaceutical drug dosage forms, was set up with the following conditions: dissolution compartment volume 2.5 mL , stirred at 120 rpm ; dissolution medium 0.01 M Tris-HCl buffer, pH 7.2. Synthetic cellulose acetate membrane (molecular weight cut-off $12,000\text{--}14,000 \text{ Da}$) was previously treated with milli Q water at 100°C for 5 min and washed with 0.01 M , pH 7.2, Tris-HCl buffer. The membrane was fixed at the end of the glass cylinder of a diffusion cell. The experiment was carried out on preparations A–E described in Table 1. Sample of $100 \text{ }\mu\text{L}$ were withdrawn from the receptor phase at 30 min , 1 h , 8 h and 24 h . Doxorubicin was quantitatively determined by HPLC with the UV-vis detector at 485 nm , as previously described [11].

3. Results and discussion

The pseudo-ternary phase diagram obtained for SPC/EU/SO, CHO and aqueous buffer (Fig. 1) was comparable to others described previously for similar mixtures [11] and is presented here to illustrate the microemulsion region used in this study.

Varying the specific composition of the mixtures allows a wide variety of formulations that differ in their mechanical behavior and solubility for lipophilic and amphiphilic drugs, such as DOX. Taking into account the previous rheological results [11] that reveal the dependence of the mechanical properties on the composition of the microemulsions (Table 1), a systematic structural study of samples prepared at various surfactant/oil ratios was carried out by polarized light microscopy, small-angle X-ray diffraction (SAXS) and X-ray diffraction (XRD) aiming to establish useful relationships between the structural aspects of the microemulsions and the drug-delivery profile for DOX.

The samples (Table 1) were prepared with the various surfactant/oil phase ratios and constant water content (80% , w/w). Here, we will discuss the effect of the composition of the formulations on the structure of the systems obtained by mixing the components.

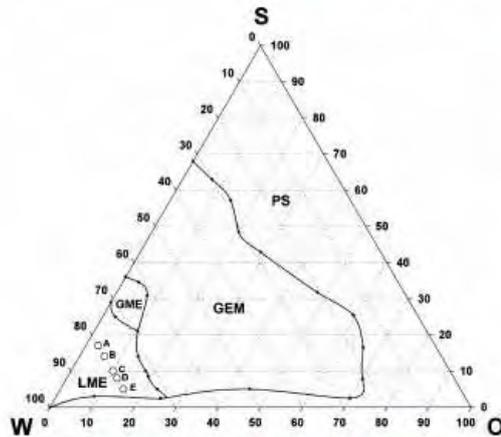


Fig. 1. Pseudo-ternary phase diagram of the systems containing SPC/EU/SO (35:35:30, w/w) (S), CHO (O) and aqueous buffer (W). Key: (LME) liquid microemulsion; (GME) gel microemulsion; (GEM) gel emulsion; (PS) phase separation; (○) specific composition of the microemulsions at 25 °C [DOX]=2 mg/mL.

Isotropic and anisotropic materials can be distinguished by polarized light microscopy. The optical properties of anisotropy can be used to reveal information about the structure and composition of materials, such as ME. Since isotropic materials have only one refractive index and no restriction on the direction of vibration of light passing through them, they exhibit the same optical properties in all directions. On the other hand, anisotropic materials have optical properties that change with the orientation of the incident light with respect to the crystallographic axes, exhibiting a range of refractive indices depending on the direction of propagation of light through the substance and on the orientation of the vibration plane [3,26,27].

The photomicrographs of DOX-unloaded and DOX-loaded ME, examined by polarized light microscopy, are shown in Fig. 2.

Sample ME A, prepared with 1.5% CHO, showed isotropic behavior, characterized by a dark field for both DOX-unloaded (Fig. 2a) and DOX-loaded (Fig. 2b) samples. Moreover, the sample prepared with 3% of CHO (ME B) showed similar isotropic characteristics. This type of results for systems formed by surfactant/water/oil phases can be attributed either to microemulsified or micellar systems or to a cubic liquid-crystalline structure. However, the apparent viscosity of these samples was previously found to be low [11] and, as it is well known that the apparent viscosity for cubic liquid crystals is very high [7,27], we can accept that in samples ME A and ME B, microemulsified sys-

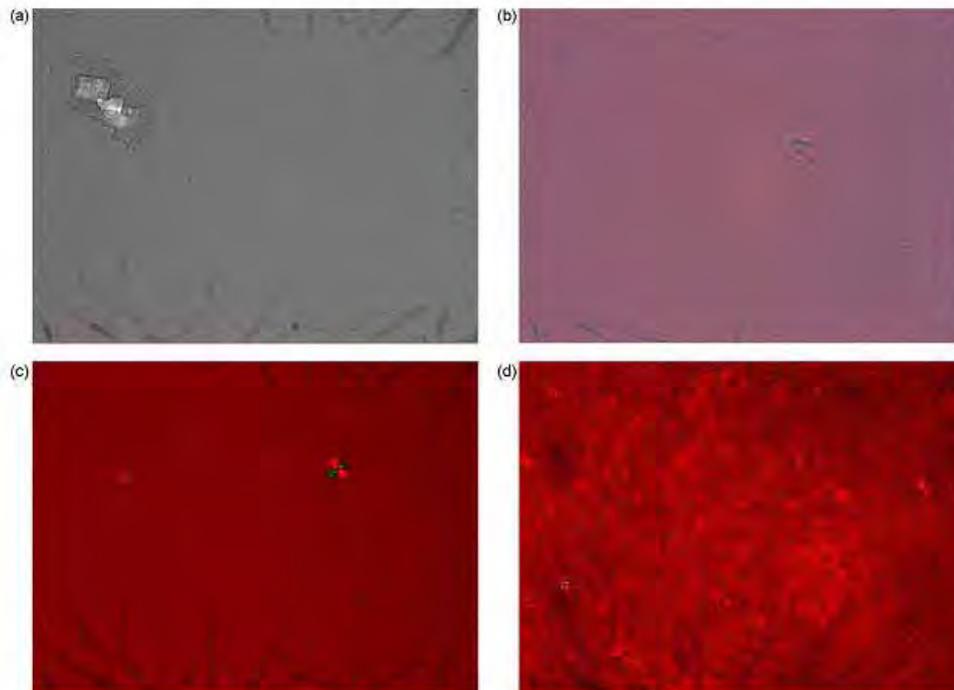


Fig. 2. Photomicrograph of ME stabilized with EU/SPC/SO. Key: (a) DOX-free ME A; (b) DOX-loaded ME A; (c) DOX-free ME C; (d) DOX-loaded ME C.

tems are formed. Comparison of the micrographs in Fig. 2a and b suggests that at low CHO concentrations the incorporation of DOX does not strongly change the structure of the samples. On the other hand, for ME C (the ME D and ME E samples, with 6 and 7.5% of CHO, respectively, gave similar micrographs), containing 5% CHO, the images shown in Fig. 2c for DOX-unloaded and Fig. 2d for DOX-loaded samples revealed differences from those for samples containing lower CHO concentrations. In the DOX-unloaded sample micrograph, a Maltese cross is observed, characteristic of lamellar structure (Fig. 2c), indicating either that the CHO increased the structural organization of the surfactant molecules or that it crystallized into a lamellar crystalline phase. The clear presence of a great number of well-defined Maltese crosses (Fig. 2d) indicates that the influence of the CHO on the structure is stronger in DOX-loaded samples. The results in Fig. 2 are coherent with rheological studies showing an increase in the apparent ME viscosity with the CHO content this enhancement being larger when DOX was incorporated in the ME [11]. This effect on the apparent viscosity could be related to the change from the microemulsion to a lamellar structure or to the presence of small cholesterol crystallites [7,27].

Fig. 3 shows the SAXS plots for all the samples.

For DOX-unloaded samples (Fig. 3a), the SAXS patterns show a broad and intense peak, characteristic of particles or aggregates with strong spatial ordering. For lower CHO concentrations (ME A and ME B), the maximum of this peak is located

at $q=0.073$. When the CHO concentration was increased, the peak shifted from $q=0.073$ to 0.0892 \AA^{-1} . As the distance between the particles is $d=2\pi/q_{\text{max}}$, where q_{max} is the q value of the peak, the observed displacement to high q -values reflects a decrease in the distance between the scattering objects from 86 for 70 Å. For DOX-free samples with high cholesterol contents, the peaks were visible (marked by asterisk in Fig. 3a) but of weak intensity, probably due to the presence of a small percentage of lamellar phase or cholesterol crystallites. This feature was confirmed by the presence of small amounts of poorly Maltese crosses (Fig. 2a). For DOX-loaded ME, broad peaks at low q were also observed, at lower CHO contents. However, for ME B, there is an increase in the intensity at very small q , characteristic of the growth of aggregates or more ordered structure formation. This behavior was confirmed by the presence of two well-defined peaks at small q for samples with intermediate CHO contents (ME C and ME D), characteristic of more ordered structures, such as liquid-crystalline or crystalline phases. The ratio of the distances of the two peaks was 1:2, indicating the presence of a 1D lamellar structure, corroborating the polarized light microscopy results. For samples containing high cholesterol contents (MEE) a broad peak is observed, suggesting a loss of lamellar organization and the appearance of a new phase. For both DOX-unloaded and DOX-loaded samples, the structural parameters were determined by fitting the experimental results to the Beaucage Model [22]. The results are shown in Table 2 for DOX-unloaded and in Table 3 for DOX-loaded samples.

For samples ME A–D, irrespective of the presence of doxorubicin, the results revealed that the radius of gyration (R_g), directly related to the size of the scattering objects (droplets or aggregates) and the distance between the scattering objects (d), does not change significantly with an increase in CHO content from 1.5 to 3, suggesting that the primary particles (droplets) are not affected by this increase. However, the packing factor (k), related to the degree of compactness of the aggregates, is strongly affected by the increase in CHO content. This fact can be explained by the presence of various amounts of small crystallites of cholesterol mixed with the microemulsion systems, promoting an increase in the width of the SAXS peaks (for DOX-unloaded ME) and the formation of new well-defined peaks related to the greater amount of crystallized cholesterol (for DOX-unloaded samples, asterisks in Fig. 3a and for DOX-loaded samples, Fig. 3b). These observations are confirmed in the analysis of the X-ray diffratograms, described below.

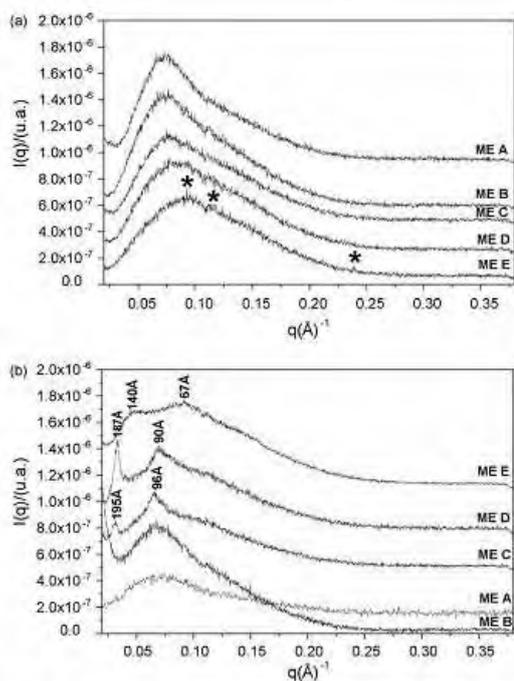


Fig. 3. Structural evolution of ME stabilized with EU/SPC/SO. SAXS profiles for (a) DOX-free ME; (b) DOX-loaded ME.

Table 2
Structural parameter values obtained from the fit of SAXD curves for empty ME stabilized by EU/SPC/SO

Formulations	[CHO] (%)	R_g (Å)	k	d (Å)	Structure
ME A	1.5	38.02	1.70	83.30	ME
ME B	3.0	38.09	0.85	89.80	ME
ME C	5.0	35.45	0.96	88.10	ME
ME D	6.0	34.84	0.38	89.80	ME
ME E	7.5	32.756	0.66	70.00	ME

R_g = radius of gyration of droplets; k = packing factor; d = distance between droplets.

Table 3
Structural parameter values obtained from the fit of SAXD curves for DOX-loaded ME stabilized by EU/SPC/SO

Formulations	[CHO] (%)	R_g (Å)	k	d (Å)	a (Å)	Structure
ME A	1.5	41.05	1.37	79.24	–	ME
ME B	3.0	35.31	1.02	83.89	–	ME
ME C	5.0	31.50	1.92	86.82	194.27	ME and lamellar CHO
ME D	6.0	32.56	0.12	82.60	183.81	ME and lamellar CHO
ME E	7.5	28.77	0.89	84.07	137.71	ME and lamellar CHO

R_g = radius of gyration of droplets; k = packing factor; d = interdroplet distance; a = lattice parameter.

For the sample ME E, containing high cholesterol content, the SAXS curves revealed a decrease in the intensity and shift of the peaks related to crystalline cholesterol to higher q -values, suggesting the presence of cholesterol polymorphs. The presence of the broad peak attributed to correlation between the droplets suggests the appearance of more cholesterol crystalline phases. It is well known that in concentrated CHO systems, the presence of phosphatidylcholine can promote the crystallization of the cholesterol polymorphs [28–30]; however, while this crystallization can be observed by small-angle X-ray scattering (SAXS), it is sometimes not clearly observed by X-ray diffraction (XRD).

An excellent fit between the experimental data curve and the theoretical Beaucage Model was obtained for all the samples. Fig. 4 shows the data for one representative sample, ME A, fitted to the model curve.

The X-ray diffractograms of the precursors used to obtain all the ME samples are shown in Fig. 5a and those of DOX-loaded samples in Fig. 5b. We can observe that both CHO and DOX produce well-defined diffraction peaks, characteristic of crystalline structures. For DOX-loaded samples, the diffractograms confirm the presence of crystalline phases, especially for samples with high cholesterol contents (ME D and ME E). Comparing the diffraction peak positions revealed the presence of a crystalline cholesterol phase, characterized by peaks similar to the most intense diffraction peaks observed for the precursor, CHO (Fig. 5a), d at $2\theta = 5.04$, 14.18, 15.29 and 42.36.

However, we can observe one inversion of intensity. For precursor CHO, the peak related to 100% intensity is located at $2\theta = 14.18$, while for both ME D and ME E, the peak related

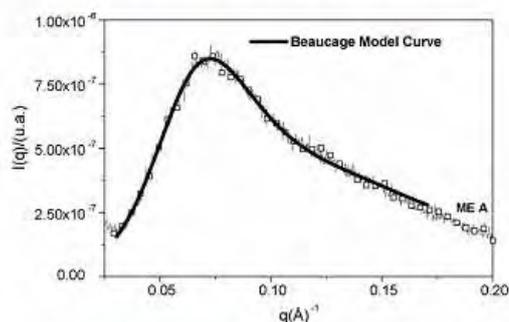


Fig. 4. Plot of the scattering intensity $I(q)$ against the scattering vector (q) for ME A sample region. (—) Theoretical Beaucage Model fit.

to 100% intensity is located at $2\theta = 5.04$, suggesting the crystallization of hydrated cholesterol or polymorph phases [28–30].

The drug-release profiles are shown in Fig. 6.

We can observe that raising the CHO content hinders DOX release, and this may be due to two causes. The first is the influence of CHO on the wrapping the phospholipid (SPC) molecules, inducing the formation of more organized and consequently more rigid structures, decreasing the DOX molecule mobility and complicating the exit of the drug from the oil droplet [31]. The second cause is related to the crystallization of the cholesterol polymorphs [28–30], causing a higher retention of the incorporated DOX. These results are in agreement with the polarized light microscopy, SAXS and X-ray diffraction results, showing that the proportions of the components in the ME formulation influence the structural variations,

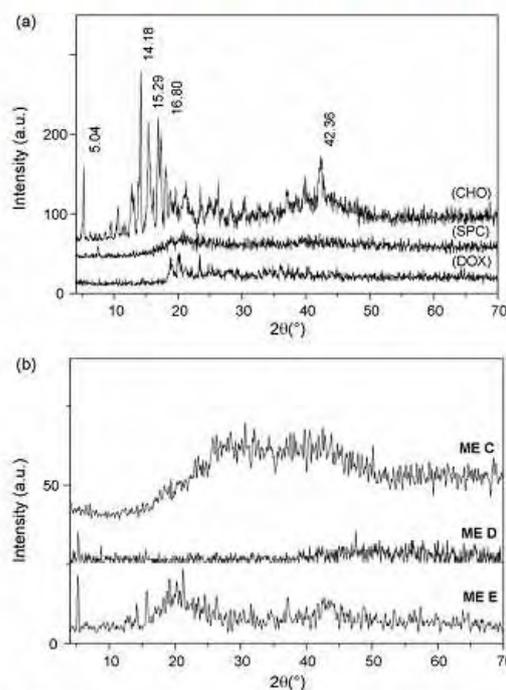


Fig. 5. Diffraction patterns evolution of DOX-loaded ME. Key: (CHO) cholesterol; (SPC) soya phosphatidylcholine; (DOX) doxorubicin.

34

T.P. Formariz et al. / Colloids and Surfaces B: Biointerfaces 60 (2007) 28–35

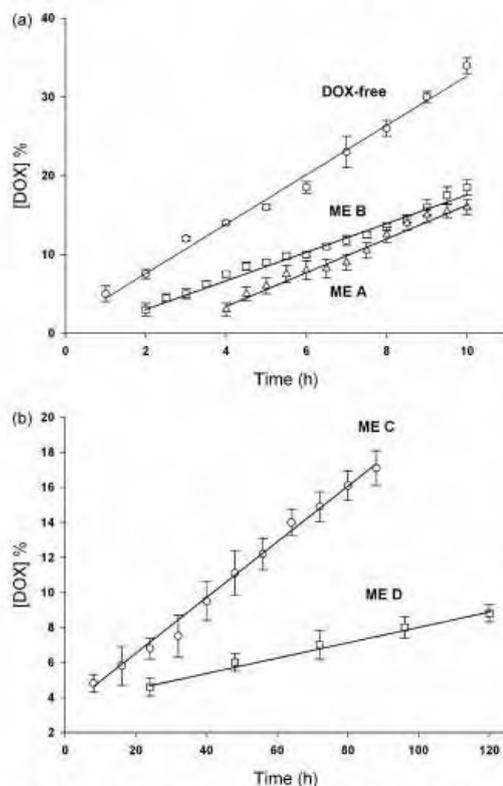


Fig. 6. Drug-release profile of ME stabilized with EU/SPC/SO (see Table 1 for details of ME).

mechanical properties and consequently the DOX-release profiles. The results in Fig. 6 also demonstrate the strong effect of the hydrophobic region of the DOX molecule on the solubilization of the drug in the internal phase of the MEs. In addition, as the presence of sodium oleate in the surfactant mixture produced a negative charge on the oil droplet, the cationic DOX was also attracted electrostatically, binding more efficiently to the ME surface.

Only for comparison of the structural variation in the ME systems with the *in vitro* DOX release, an initial release study was carried out, without the intention of depleting the ME drug content.

The results of the initial drug release are shown in Fig. 6 and Table 4. The DOX concentration released was linear with time within the limits of the study. The straight lines obtained were fitted by linear regression, with excellent correlation coefficients.

It was demonstrated that the incorporation of DOX into the microemulsified systems provoked a great effect on the release process. Analysis of the results shown in Fig. 6 revealed that the presence of ME reduced the release rate constant by a factor about 1.9, when the system remained in the ME structure

Table 4

Release rates from the linear fit for DOX-release from ME

Formulation	Release rate	Ratio of rate of release	r^2
DOX-free	3.140	1	0.997
ME A	1.790	0.57	0.998
ME B	2.170	0.69	0.997
ME C	0.162	0.051	0.999
ME D	0.043	0.014	0.999

r^2 : Correlation coefficient.

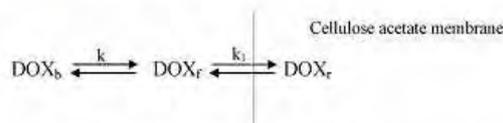
(ME A and ME B) with low CHO proportions. However, when the CHO content increased and the system showed CHO-related lamellar phases, the inhibition was extremely high, 20 and 73-fold for ME C and ME D, respectively. For ME E, it was not possible to determine the initial rate of release, because the DOX was entirely restrained inside the system within the experimental time limits, suggesting that the lamellar phases formed had immobilized the drug in the ME structure.

The long-time release profile of DOX from ME systems (Fig. 6) suggests that the drug release probably occurs in two steps, the first involving the exit of DOX from the ME oil phase, producing DOX-free molecules, and the second related to diffusion of free-DOX across the cellulose acetate membrane of the diffusion cell.

This DOX-release process (Fig. 6) is summarized in Scheme 1. Scheme 1 shows that if $k < k_1$, the first step of the DOX release should be the limiting step of the release process. In fact, in the data shown in Fig. 6, it is clear that the incorporation of DOX in the ME systems produced a decrease in the rate of release of DOX (Table 4). It was demonstrated that the rate constant is extremely dependent on the surfactant/cholesterol ratio in the formulations and the consequent lamellar phase formation.

Also it is important to approach that beyond the mentioned aspects, the incorporation of the DOX in ME may be described through the equilibrium of the DOX between the aqueous and the oil phases of ME. Therefore, the ratio of the rate of DOX release from ME (Table 4) also reflects directly the decrease of the free-DOX from the aqueous phase with the increase of CHO (oil phase) in the formulations (Table 1).

In general, the interaction of DOX with the carrier system plays an important role in the control of the rate of release (Fig. 6). However, the mechanism of DOX release incorporated in these systems, with crystalline structures mixed with microemulsions, depends on the amount and the nature of crystalline structure (hydrated or polymorphs phases, by example) as well as on the physicochemical characteristics of the drug. These results show that the association of microemulsions and crystalline phases can enhance extensively the solubilization and controlled release of DOX.



Scheme 1. Schematic release of DOX from ME.

4. Conclusions

This study provides evidence of excellent agreement between the various structural characteristics of the studied MEs and their drug-release profiles, a decrease in the rate of DOX release being related to the more effective crystallization of CHO in the systems prepared with higher CHO contents. The DOX–ME interactions and the resulting structure can control the drug solubility and release rate. We conclude that the system described can be used as a drug carrier for doxorubicin administration.

Acknowledgements

The authors wish to thank FAPESP, CNPq and PADCFAR for the financial support and the National Laboratory of Synchrotron Light-LNLS, Campinas-SP, Brazil, for the SAXS measurements. They also acknowledge the help of Timothy Roberts (M.Sc.) in checking the English text.

References

- [1] S. Gibaud, M. Demoy, J.P. Andreux, C. Weingarten, B. Gouritin, *J. Pharm. Sci.* 85 (1996) 950.
- [2] D.G. Rodrigues, C.C. Covelan, S.T. Coradi, R. Barboza, R.C. Maranhão, *J. Pharm. Pharmacol.* 54 (2002) 772.
- [3] M.C. Chang, R. Bodmeier, *Int. J. Pharm.* 147 (1997) 135.
- [4] B. Baroli, M.A. López-Quintela, M.B. Delgado-Charro, A.M. Fadda, J. Blanco-Méndez, *J. Control. Rel.* 69 (2000) 218.
- [5] T.P. Formariz, M.C.C. Urban, A.A. Silva-Júnior, M.D. Gremião, A.G. Oliveira, *Rev. Bras. Ciên. Farm.* 41 (2005) 313.
- [6] L. Brinon, S. Geiger, V. Alard, J. Doucet, J.-T. Tranchant, G. Coumraze, *J. Control. Rel.* 60 (1999) 67.
- [7] N.H. Gabboun, N.M. Najib, H.G. Ibrahim, S. Assaf, *Int. J. Pharm.* 212 (2001) 73.
- [8] E. Farkas, R. Zelkó, G. Török, I. Rácz, S. Marion, *Int. J. Pharm.* 213 (2001) 1.
- [9] S. Ezrahi, A. Aserin, N. Garti, in: P. Kumar, K.L. Mittal (Eds.), *Handbook of Microemulsion Science and Technology*, Marcel Dekker, New York, 1999 (Chapter 7).
- [10] M.A. Correa, M.V. Scarpa, M.C. Franzini, A.G. Oliveira, *Colloids Surf. B* 43 (2005) 112.
- [11] T.P. Formariz, V.H.V. Sarmiento, A.A. Silva-Junior, M.V. Scarpa, C.V. Santilli, A.G. Oliveira, *Colloids Surf. B* 51 (2006) 61.
- [12] S. Mitra, U. Gaur, P.C. Ghosh, N.A. Maitra, *J. Control. Rel.* 74 (2001) 323.
- [13] H.S. Yoo, K.E. Lee, J.E. Oh, T.G. Park, *J. Control. Release* 68 (2000) 431.
- [14] A. Miglietta, R. Cavalli, C. Boeca, L. Gabriel, M.R. Gasco, *Int. J. Pharm.* 210 (2000) 67.
- [15] G. Sacco, M. Bigioni, S. Evangelista, C. Goso, S. Manzini, C.A. Maggi, *Eur. J. Pharm.* 414 (2001) 78.
- [16] M.A. Correa, M.V. Scarpa, M.C. Franzini, A.G. Oliveira, *Colloids Surf. B* 43 (2005) 114.
- [17] M.E. Dalmora, A.G. Oliveira, *Int. J. Pharm.* 184 (1999) 157.
- [18] I. Ahmad, M. Longenecker, J. Samuel, T.M. Allen, *Cancer Res.* 53 (1993) 1488.
- [19] T.M. Allen, *TI/Pharmacol. Sci.* 15 (1994) 215.
- [20] R.C. Maranhão, S.R. Graziani, N. Yamaguchi, R.F. Melo, M.C. Latrilha, D.G. Rodrigues, R.D. Couto, S. Schreier, A.C. Buzaid, *Cancer Chemother. Pharmacol.* 49 (2002) 498.
- [21] A. Guinier, *Théorie et technique de la radiocristallographie*, Dunod, Paris, 1964 (Chapter 1).
- [22] G. Beaucage, T.A. Ulibarri, E.P. Black, D.W. Schaefer, *Hybrid Organic Inorganic Composites*, American Chemical Society, Washington, 1995 (Chapter 9).
- [23] H.P. Klug, *X-ray Diffraction Procedures*, John Wiley & Sons, New York, 1954 (Chapter 1).
- [24] *The United States pharmacopoeia*, 24th ed., The United States Pharmacopoeial Convention, Rockville, 2000, p. 2569.
- [25] M.E. Dalmora, S.L. Dalmora, A.G. Oliveira, *Int. J. Pharm.* 222 (2001) 45.
- [26] T. Norling, P. Lading, S. Engstrom, K. Larsson, N. Krog, J. Nissen, *Clin. Periodontol.* 19 (1992) 692.
- [27] S.T. Hyde, *Handbook of Applied Surface and Colloid Chemistry*, John Wiley & Sons, New York, 2001 (Chapter 1).
- [28] C.R. Loomis, G.G. Shipley, D.M. Small, *J. Lipid Res.* 20 (1979) 535.
- [29] R.M. Epanand, D. Bach, N. Borochoy, E. Wachtel, *Biophys. J.* 78 (2000) 873.
- [30] R.M. Epanand, D. Bach, R.F. Epanand, N. Borochoy, E. Wachtel, *Biophys. J.* 81 (2001) 1520.
- [31] O. Tirosh, R. Kohen, J. Katzhendler, A. Alon, Y. Barenholz, *Chem. Phys. Lipids* 87 (1997) 22.

Available online at www.sciencedirect.com

Colloids and Surfaces B: Biointerfaces 63 (2008) 287–295

**COLLOIDS
AND
SURFACES**
B
www.elsevier.com/locate/colsurfb

Structural changes of biocompatible neutral microemulsions stabilized by mixed surfactant containing soya phosphatidylcholine and their relationship with doxorubicin release

T.P. Formariz^a, L.A. Chiavacci^a, V.H.V. Sarmiento^b, C.M. Franzini^a, A.A. Silva-Jr.^a,
M.V. Scarpa^a, C.V. Santilli^b, E.S.T. Egito^c, A.G. Oliveira^{a,*}

^a Departamento de Fármacos e Medicamentos, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, UNESP, Rodovia Araraquara-Jaú km 01, 14801-902 Araraquara, SP, Brazil

^b Departamento de Físico-Química, Instituto de Química, UNESP, Rua Francisco Degni s/n, Quitandinha, 14800-900 Araraquara, SP, Brazil

^c Departamento de Farmácia, Centro de Ciências da Saúde-UFRN, Rua Gal. Gustavo Cordeiro de Farias s/n, 59010-180 Natal, RN, Brazil

Received 12 July 2007; received in revised form 13 December 2007; accepted 18 December 2007

Available online 31 January 2008

Abstract

Depending on the composition, the mixture of surfactant, oil and water, may form supramolecular aggregates with different structures which can significantly influence the drug release. In this work several microemulsion (ME) systems containing soya phosphatidylcholine (SPC) and eumulgin HRE40TM (EU) as surfactant, cholesterol (O) as oil phase, and ultra-pure water as an aqueous phase were studied. MEs with and without the antitumoral drug doxorubicin (DOX) were prepared. The microstructures of the systems were characterized by photon correlation spectroscopy, rheological behavior, polarized light microscopy, small-angle X-ray scattering (SAXS) and X-ray diffraction (XRD). The results reveal that the diameter of the oil droplets was dependent on the surfactant (S) amount added to formulations. The apparent viscosity was dependent on the O/S ratio. High O/S ratio leads to the crystallization of cholesterol polymorphs phases which restricts the mobility of the DOX molecules into the ME structure. Droplets with short-range spatial correlation were formed from the ME with the low O/S ratio. The increase of the cholesterol fraction in the O/S mixture leads to the formation of ordered structures with lamellar arrangements. These different structural organizations directly influenced the drug release profiles. The *in vitro* release assay showed that the increase of the O/S ratio in the formulations inhibited the constant rate of DOX release. Since the DOX release ratio was directly dependent on the ratio of O/S following an exponential decay profile, this feature can be used to control the DOX release from the ME formulations.

© 2008 Elsevier B.V. All rights reserved.

Keywords: Microemulsion; Cholesterol; Lamellar structures; Drug delivery; Doxorubicin

1. Introduction

Depending on the composition, the mixture of surfactant, oil and water, may form supramolecular aggregates with different structures [1]. Among these structures microemulsions (MEs) and lyotropic mesophases as liquid crystals (LCs) are closely related with the nature and the proportion of the components of the pharmaceutical formulation. The role of these systems in

the solubility and transport of molecules with different physicochemical properties strongly influences the drug incorporation and drug release [2]. Thus, microemulsions have been used as drug carriers for a number of therapeutical compounds with different hydrophilic-lipophilic properties [3–5]. Depending on the drug polarity, MEs and LCs can be used to optimize therapeutic effects through the control of rates and drug release mechanisms [1].

Microemulsions can be described as a mixture of water and immiscible oil stabilized by surfactant molecules. Unlike emulsions, these systems are in thermodynamic equilibrium and exhibit an astonishing range of structures. Depending

* Corresponding author. Tel.: +55 16 3301 6974; fax: +55 16 3301 6960.
E-mail address: oliveia@fcar.unesp.br (A.G. Oliveira).

on the spontaneous curvature and flexibility of the surfactant monolayer, O/A and A/O microemulsions and bicontinuous structures are known [6,7]. Excess of surfactant interacts with other components such as cholesterol either at droplet–water interfaces or in the continuous phase to produce complex multiphase systems [8]. The physicochemical characteristic, surfactant concentrations and the oil phase composition are important factors affecting the structure and the properties of ME [9].

Thus, the effect of cholesterol on the structural and thermodynamic properties of model lipid microemulsion has been studied [10]. The results showed that the lateral organization of lipids seems to result from preferential packing of the phospholipids and cholesterol into rafts onto which proteins interact especially with the cellular bilayer [10]. When the concentration of cholesterol exceeds the limit of the solubility in the lipid bilayer, the deposition of crystalline cholesterol was observed [11]. Depending on the ratio of cholesterol and surfactant, several isotropic and anisotropic liquid crystalline phases with different microstructures such as cubic, hexagonal and lamellar phases, and crystals of cholesterol may be formed [12–16].

Doxorubicin (DOX), 10-(4-amino-5-hydroxy-6-methyl-tetrahydropyran-2-yl)oxy-6,8,11-trihydroxy-8-(2-hydroxyacetyl)-1-methoxy-7,8,9,10-tetrahydrotetracene 5,12-dione (CAS 23214-92-8), a well-known anticancer drug, is an anthracycline antibiotic, with a broad spectrum of antitumor activity, including various human and animal solid tumors [17]. DOX is an intercalating drug that stacks between paired bases in DNA. The amount of DNA-bound drugs is reduced by cellular resistance mechanisms, which include membrane transport mechanisms such as the P170 glycoprotein or others as well as intracellular vesicular trapping [18,19]. However, the potential of therapeutic application of the DOX has been severely restricted by the dose-limited cardiotoxicity and myelosuppression [18–20]. Thus, it is of obvious relevance to study the new carrier systems to improve the administration of antitumor drugs.

In previous works a promising anionic microemulsion vehicle containing cholesterol as oil phase, stabilized by the surfactant mixture of soya phosphatidylcholine (SPC)/Eumulgin HRE40TM/sodium oleate, and the aqueous buffer was studied in detail as a drug carrier for doxorubicin [2,7]. The results indicated that the drug interacts with the oil core structure, slightly increasing the average of the droplets diameter and the drug solubility [7]. The study of the microstructure organization demonstrated that ordered lamellar arrangements were responsible by the significant decrease of the rate release constant of the drug from ME [2].

The main purpose of this work was to understand the formation of the different microstructures in the biocompatible ME containing cholesterol as oil phase stabilized by soya phosphatidylcholine/Eumulgin HRE40TM surfactants, for explaining the different delivery behavior of DOX. Therefore, microemulsions were obtained with and without the antitumoral doxorubicin. The microstructures were characterized by polarized light microscopy, photon correlation spectroscopy, X-ray

diffraction (XRD), and small-angle X-ray scattering (SAXS). Also the ability to incorporate and release doxorubicin in such system was evaluated.

2. Materials and methods

2.1. Materials

Soya phosphatidylcholine (Epikuron 200TM) was purchased from Degussa Texturants Systems Deutschland GmbH and Co. (Hamburg, Germany); cholesterol (O), cellulose acetate membrane (MW 12,000–14,000), Tris(hydroxymethyl)amino methane were from Merck, Darmstadt, F.R. Germany; doxorubicin hydrochloride (AdriamycinTM RD); polyoxyethyleneglycerol trihydroxystearate 40 (Eumulgin HRE 40TM) (EU) were obtained from Pharna Special, São Paulo, Brazil. Water was purified in a Milli Q Plus system (Millipore) and its resistivity was 18.2 MΩ cm. All other solvents and chemicals were of an analytical grade.

2.2. Microemulsion preparation

2.2.1. Preparation of DOX-unloaded ME and DOX-loaded ME

Cholesterol was added to the semisolid mixture of SPC/EU (S). To the surfactant and oil phase, the aqueous phase (80%, w/w) was added and the mixture was stirred for 10 min. After that this admixture was left for 24 h at 25 ± 0.1 °C, to reach total equilibrium. The samples were then centrifuged at 8500 × g for 15 min, to eliminate the titanium residues that may be released from the sonicator tip. The appropriate amounts (2 mg/mL) of DOX were dissolved directly in the previously prepared microemulsions. All the studied formulations are shown in Table 1.

2.3. Microemulsion characterization

2.3.1. Photon correlation spectroscopy

The particle size analysis was carried out using photon correlation spectroscopy (Brookhaven Instruments Corporation, EMI 9863 model, apparatus with laser source He-Ne 10 mW, 532 nm-HUGHES, self-correlator, 64 channels). Prior to the analysis, samples were diluted with buffer Tris–HCl 0.01 M pH 7.2 and filtered (0.22 μm). The size measurements were performed at an angle of 90°. The correlator was operated in parallel mode and the cumulant method of analysis was used to calculate the mean sample size according to the intensity of the scattered light (Z —average diameter). All results are the mean and standard deviation (S.D.) of at least 10 measurements. The measurements were performed at 25.0 ± 0.2 °C.

Table 1
Composition of the ME formulations

ME composition (w/w) (%)	ME A	ME B	ME C	ME D	ME E
SPC/EU (1:1) (S)	17.0	14.0	10.0	8.0	5.0
CHO (O)	3.0	6.0	10.0	12.0	15.0
Aqueous phase (W)	80.0	80.0	80.0	80.0	80.0

2.3.2. Apparent viscosity

The apparent viscosity of drug-loaded and drug-unloaded MEs were performed using a controlled-stress Carrimed CSL 100 rheometer (TA instruments) with cone-plate geometry. The cone-plate geometry is a 2° stainless steel cone with a 4-cm diameter and a gap of 55 μm between the cone and plate. The apparent viscosity (η_{app}) was determined at shear rate of 60 s⁻¹. The apparent viscosity determinations were carried out in triplicate for all samples at 25.0 ± 0.2 °C.

2.3.3. Polarized light microscopy

Samples were prepared by placing a drop of ME between a cover slip and a glass slide and then examined under polarized light. An Optical Leica Microscope equipped with a digital camera was used to analyze various fields of each sample at room temperature. The isotropic or anisotropic behavior of the samples was observed. Pictures were taken at a magnification 20,000×.

2.3.4. SAXS measurements and data analysis

The nanostructure of the phases was studied by small-angle X-ray scattering measurements. Data collection was done at the synchrotron SAXS beam line, equipped with an asymmetrically cut and bent Si(111) monochromator ($\lambda = 1.608 \text{ \AA}$), which yields a horizontally focused beam. A vertical position-sensitive X-ray detector and a multichannel analyser were used to record the SAXS intensity, $I(q)$, as a function of the modulus of the scattering vector q , $q = (4\pi/\lambda) \sin(\epsilon/2)$, ϵ being the scattering angle. The parasitic scattering produced by slits was subtracted from the total scattering intensity. Both scattering intensities were recorded in relative units but, for a quantitative comparison, they were normalized to the same experimental conditions. As the incident X-ray beam has a point-like cross-section at the detection plane and the width of resolution detector slit was small, no mathematical desmearing of the scattering curves was performed.

For systems produced by an association of surfactant, water, and oil phase, it is well known, that at low surfactant concentration, below the critical micellar concentration (CMC), the SAXS intensity is similar to that observed for diluted and monodispersed particles. At surfactant concentration higher than its CMC, an interaction between surfactant molecules occurs in different degrees and arrangements. The scattering patterns can be similar to that observed for a set of uncorrelated particles dispersed in a homogeneous matrix at low- q range produced by an isotropic system and can be described by Guinier's law, which strictly applies to the low- q limit and may be used as a good approximation within a more or less wide q range depending on the shape and size distribution of the scattering particles. Assuming that this law actually holds for a given diluted set of particles within a rather wide range of q , the scattering intensity that would be observed if the same particles were spatially correlated is given by [21]:

$$I(q) = G e^{-R_g^2 q^2 / 3} S(q) \quad (1)$$

where $G = NV^2(\rho_p - \rho_m)^2$, ρ_p and ρ_m being the electron densities of the particles and the matrix, respectively, V the particle volume, and N the number of particles in the irradiated sample. R_g is the average of the radius of gyration of the particles and $S(q)$ is the structural function accounting for the spatial correlation of the particles.

For systems formed by correlated particles as micelles, microemulsions, and liquid crystalline phases, the SAXS curves present a broad band or very wide peaks associated with the short-range 3D spatial correlation of the micelles or microemulsions particles [12,13,16]. For these cases a simple structure function proposed by Beaucage [22] in order to model the scattering intensity produced by a dense set of spherical particles is given by

$$S(q) = \frac{1}{1 + k\theta} \quad (2)$$

k being a packing factor equal to $8V/V_0$ where V is the average hard-core volume and V_0 is the average volume available to each sphere. The form factor θ is related to the average interparticle distance d and done by $\theta = 3[\sin(qd) - qd \cos(qd)]/(qd)^3$. Eq. (2) actually applies to a set of particles with spherical shape but it can be used as a more or less good approximation for other nearly isodiametric particles with a narrow size distribution.

For more ordered systems the intensity $I(q)$ produced by the scattering of these materials can exhibit Bragg peaks for different values of the modulus of the scattering vector q , and the scattering technique can be named SAXD. If the SAXD patterns contain several peaks, their positions in the q -axis reveal the type of the crystalline lattice of the structures and permit determining their lattice parameters [23].

2.3.5. X-ray diffraction

The crystalline structure of the samples was analyzed by powder X-ray diffraction. The data were collected on a Siemens D-500 diffractometer (Cu K α radiation, $\lambda = 1.541 \text{ \AA}$) with a curved graphite monochromator, by using the step counting method (step 0.05° and time 0.1 s) in a 2θ range between 4° and 70°.

2.3.6. In vitro drug release

To evaluate the profile of release of the doxorubicin from the ME, the apparatus described in USP Pharmacopeia [24] modified for the spectrophotometer cuvette was used [25]. The dissolution apparatus, adapted for liquid pharmaceutical drug dosage forms, was set up with the following conditions: dissolution compartment volume 2.5 mL, stirred at 120 rpm, and dissolution medium 0.01 M Tris-HCl buffer, pH 7.2. The synthetic cellulose acetate membrane (molecular weight cut-off 12,000–14,000 Da) was previously treated with ultra-pure MilliQ water at 100 °C for 5 min and washed with 0.01 M, pH 7.2, Tris-HCl buffer. The membrane was fixed at the end of the glass cylinder of a diffusion cell. The experiment was carried out at 37 ± 0.1 °C, on the preparations ME A-ME E described in Table 1. Samples were withdrawn from the receptor phase at adequate time and the DOX was quantitatively analyzed by HPLC using UV-vis detector at 485 nm, as previously described [7].

3. Results and discussion

From the initial studies with MEs, we have found more transparent formulations containing O, SPC/EU, and aqueous buffer obtained with a surfactant mixture of HLB 9.5, which is related to SPC/EU ratio of 1:1 (w/w). This surfactant composition, with HLB 9.5, was selected for the sequence of the study. For a good characterization of the ME, the determination of the oil droplet mean diameters is relevant for generating clear microemulsions.

The specific composition of the mixtures allowed a large variety of formulations with different properties and was therefore very appropriate as a vehicle for lipophilic drugs such as DOX [7]. A systematic structural study of samples prepared with different surfactant/oil contents was carried out by photon correlation spectroscopy (PCS), rheological behavior, polarization light microscopy, small-angle X-ray diffraction and X-ray diffraction aiming to establish useful relationships between the structural aspects of the so-called microemulsions and the drug delivery profile for DOX.

The ME samples (Table 1) were prepared with various oil phase/surfactant ratios and fixed water content (80%, w/w). The effect of the ME formulation composition on the structural organization of the different systems will be further discussed.

Light scattering is a routine technique for determining the diameter of the internal phase of microemulsions. The light-scattering measurements were made for liquid microemulsions diluted with aqueous buffer in order to detect experimental errors [7]. The change of the hydrodynamic diameter of the oil droplets as a function of the surfactant ratio is shown in Fig. 1. A decrease in the droplet diameters reaching a minimum with the increase of the surfactant in the formulations was verified. Thus, the decrease in diameter allowing the formation of clear to semi-transparent systems, demonstrating the good effect of the 1:1 (w/w) SPC/EU ratio in the reduction of the interfacial tension for the ME stabilization [26–29]. This profile can be explained since the surfactant organizes as a monolayer at oil–water interface reaching saturation in high proportions and leading to minimum diameters.

Besides, as the diameter of the oil droplets varies significantly depending on the formulation, with the diameter reaching a minimum with high surfactant proportions the data of Fig. 1 also clearly demonstrates that the amount of the surfactant available to stabilize the oil droplets was sufficient to coat the total area of the oil droplets of ME.

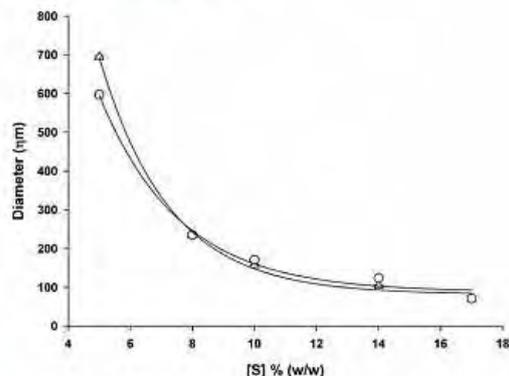


Fig. 1. Effect of the surfactant content in the formulations on the diameter of the ME, oil drops. Key: (○) DOX-unloaded ME and (△) DOX-loaded ME. Solid line calculated from Eq. (3).

Detailed data about the reduction of the diameters, including the polydispersity index (PDI) are shown in Table 2.

For both, drug-loaded and drug-unloaded MEs the diameters of the structures decreased with the S content (Fig. 1) according to a single exponential growth:

$$y = y_0 + a^{-bx} \quad (3)$$

Therefore, we have found that the incorporation of DOX in the ME induced an increase in the diameter profile of the internal oil phase of the ME. For the DOX-loaded ME, the effect seems to be a little sharper than that for the DOX-unloaded ME in low S proportions. This profile can be explained because the incorporation of the DOX in the ME occurs by hydrophobic effect with the DOX partition into the oil droplets increasing the local volume in low surfactant concentrations. In high surfactant concentrations the great reduction of the interfacial tension provoked by the increase in the surfactant proportion leads to a similar reduction in the diameter of the oil droplets for both systems. Statistical analysis using Student's *t*-test reveals that the effect of the surfactant on both, drug-loaded and drug-unloaded microemulsion was not significant ($p > 0.05$) at a 95% confidence interval.

However, although cholesterol is predominantly hydrophobic, as it contains a polar hydroxyl group, on the one hand, and a non-polar steroid ring structure and hydrocarbon tail, on the

Table 2
Evaluation of the droplet size and polydispersity of the ME by light scattering

Formulations	DOX-loaded ME		DOX-unloaded ME	
	Diameter ± S.D. (nm)	PDI ± S.D.	Diameter ± S.D. (nm)	PDI ± S.D.
ME A	70.3 ± 0.6	0.18 ± 0.03	71.3 ± 1.4	0.29 ± 0.03
ME B	104.6 ± 1.2	0.15 ± 0.02	124.1 ± 2.6	0.26 ± 0.05
ME C	157.8 ± 1.5	0.10 ± 0.02	171.3 ± 1.4	0.10 ± 0.04
ME D	234.9 ± 5.4	0.20 ± 0.05	234.9 ± 5.4	0.20 ± 0.04
ME E	694.4 ± 3.5	0.23 ± 0.03	597.4 ± 3.5	0.28 ± 0.10

Key: standard deviation (S.D.), mean of 10 determinations, polydispersity index (PDI)

other, it has a small amphiphilic property and thus some fraction of the compound may be at oil–water interface.

Since the pK_a value of DOX was taken as 8.2, at pH 7.2 the drug is predominantly hydrophobic and may be favorably partitioned into the oil phase [7]. In this experimental condition the DOX can be considered as an additional fraction of oil phase added to the ME system increasing the droplet size in low surfactant concentrations. In addition, since a small fraction of DOX is ionized in this experimental condition, the amphiphilic property of the drug drives this DOX molecules to the surfactant monolayer at oil–water interface leading to a droplet size increase. Furthermore, these phenomena can explain the parallel shift between DOX-unloaded and DOX-loaded ME data

mainly observed in low S ratios (Table 2). The polydispersity index was calculated by the average size of the droplets divided by the average number of droplets. For both, the DOX-unloaded ME and the DOX-loaded ME the PDI obtained from the light-scattering analysis showed values between 0.1 and 0.3, indicating a good size distribution of the oil droplet. This parameter directly reflects the size homogeneity of the droplets in the total volume of the ME (Table 2).

Isotropic and anisotropic materials can be distinguished by polarized light microscopy. The optical properties of anisotropy can be used to reveal information about the structure and composition of materials as ME. Since the isotropic materials have only one refractive index and restriction on the vibration direc-

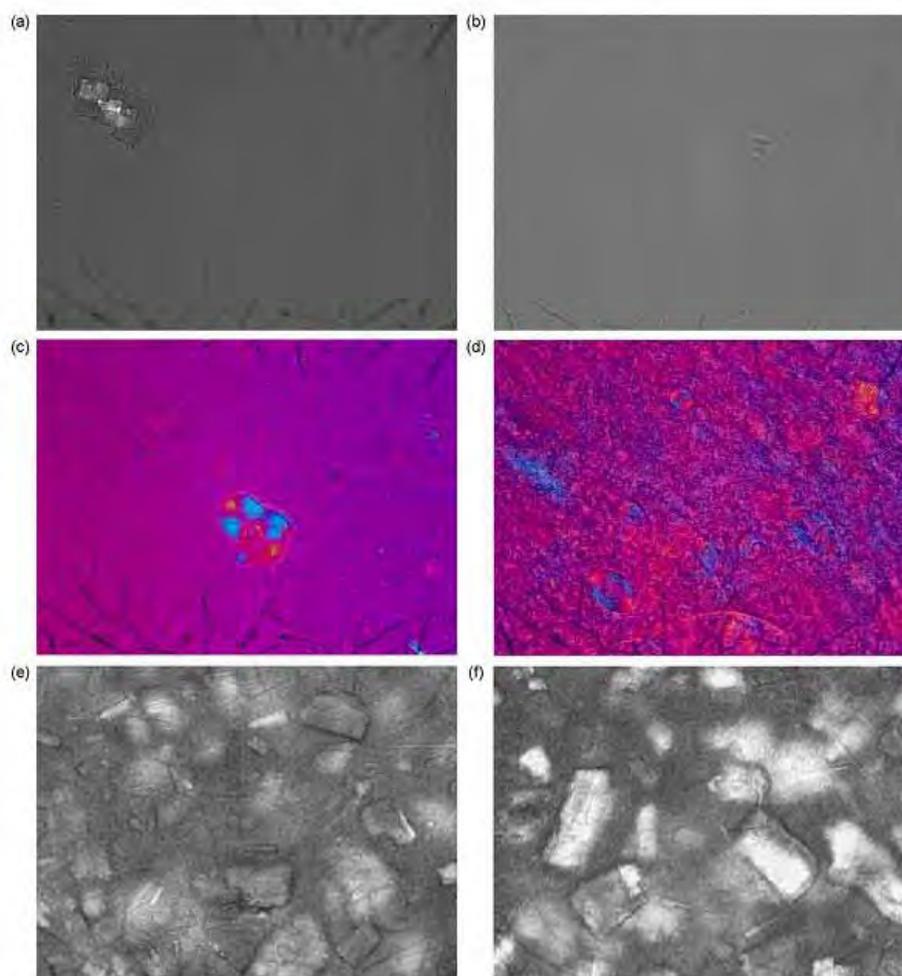


Fig. 2. Photomicrograph of ME stabilized with soya phosphatidylcholine (SPC)/EU. Key: (a) DOX-unloaded ME A; (b) DOX-loaded ME A; (c) DOX-unloaded ME B; (d) DOX-loaded ME B; (e) DOX-unloaded ME C; (f) DOX-loaded ME C.

292

T.P. Formariz et al. / Colloids and Surfaces B: Biointerfaces 63 (2008) 287–295

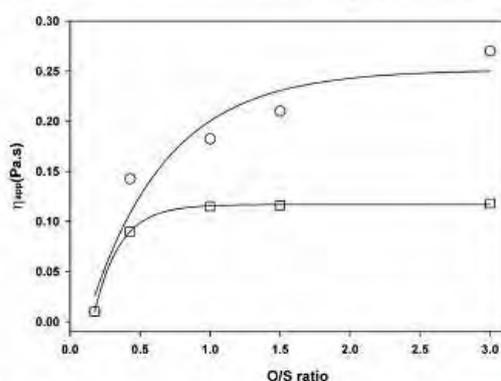


Fig. 3. Variation of the apparent viscosity with oil phase/surfactant ratio in the ME. Key: (○) DOX-loaded ME and (□) DOX-unloaded ME.

tion of light passing through them, they exhibit the same optical properties in all directions. On the other hand, for anisotropic materials optical properties change with the orientation of the incident light regarding crystallographic axes demonstrating a range of refractive indices depending on the propagation direction of light through the substance and on the coordinates of the vibration plane [2].

The photomicrographs of the DOX-unloaded ME and the DOX-loaded ME analyzed through polarized light microscopy are shown in Fig. 2.

The ME A sample (Table 1), prepared with O/S ratio of 0.176 (Table 3) showed isotropic behavior, characterized by a dark field for both, the DOX-unloaded (Fig. 2a) and the DOX-loaded (Fig. 2b) samples. This type of data for systems produced by surfactant/water/oil phase can be attributed to the formation of the α l micro-droplet and cubic liquid crystalline arrangement. However, low apparent viscosity for these samples were previously determined (Fig. 3). As it is well known that the apparent viscosity for cubic liquid crystals is very high [8,30], it can be suggested that for the ME A sample micro-dispersed droplets are formed. On the other hand, for the ME B sample containing O/S ratio of 0.429, the photomicrographs shown for the DOX-unloaded ME (Fig. 2c) and for the DOX-loaded ME (Fig. 2d) revealed differences compared with those observed for samples containing O/S ratio of 0.176. For the DOX-unloaded ME, the presence of Malta Croix, which is characteristic of lamellar arrangements (Fig. 2c), was observed, indicating the effect of the O/S variation on the structural organization of the surfactant molecules or the presence of lamellar crystalline arrangement. This feature in particular was verified for the DOX-loaded samples (Fig. 2d).

For the ME C containing O/S ratio 1.0 (Table 1), the photomicrographs shown in Fig. 2e for the DOX-unloaded ME and Fig. 2f for the DOX-loaded ME revealed different structural organization as compared with the samples containing 0.176 and 0.429 of O/S ratio. It is also important to mention that the samples ME D and ME E, with 1.5 and 3 of ratio O/S, respectively, had presented similar results.

For the DOX-unloaded ME the presence of crystals was observed (Fig. 2e) especially for samples with high O/S ratios (ME C, ME D and ME E). The increase in the presence of crystals when the DOX was incorporated into the ME (Fig. 2f) indicates that the DOX influences the formation of the crystalline structures.

The data in Fig. 3 describes that the apparent viscosity for both, the DOX-unloaded ME and the DOX-loaded ME, increased with the O/S ratio, rose to a maximum when the oil phase predominated over cholesterol in the formulations.

These results relating an increase in the apparent viscosity with the O/S modifications are in agreement with the data shown in Fig. 2. This enhancement was larger when DOX was incorporated into the ME, suggesting the possible contribution of the crystalline arrangements to the apparent viscosity of the ME [8,14,15,30].

In order to identify the crystalline species observed by the photomicrographs, the X-ray diffraction patterns of the MEs were compared with those obtained for the precursors used to prepare all the samples. Fig. 4 shows the X-ray diffraction patterns for cholesterol, DOX, and SPC (Fig. 4a), for the DOX-unloaded ME (Fig. 4b) and the DOX-loaded ME (Fig. 4c). It can be observed that all samples showed well-defined diffraction peaks, characteristic of crystalline structures. However for the increase of the O/S ratio and for the addition of DOX to the ME, an increase in the extension of the crystalline degree of samples could be observed. The comparison between the diffraction peak position for both precursors and compounds in the structured ME revealed the presence of cholesterol crystals characterized by the presence of the more intense diffraction peaks (Fig. 6a) at $2\theta = 5.04, 14.18, 15.29$ and 42.36 .

However, for the cholesterol precursor the peak related to 100% of intensity is located at $2\theta = 14.18$ and for the DOX-unloaded ME C (Fig. 4b) and the DOX-loaded ME B, ME C, and ME D (Fig. 4c) this peak is located at $2\theta = 5.04$, suggesting the crystallization of the hydrated cholesterol or polymorph phases [11,14,15].

The results described above were confirmed by the SAXS curves shown in Fig. 5 for the DOX-unloaded ME (Fig. 5a) and the DOX-loaded ME (Fig. 5b).

For the DOX-unloaded and the DOX-loaded ME A and ME B with low O/S ratios, only a large correlation peak could be observed. However, for the samples with higher O/S ratios (ME C, ME D and ME E) a well-defined diffraction peak was observed (Fig. 5a and b). The correlation distances between these peaks (equal to 2) are in agreement with the cholesterol lamellar arrangement. However, since the large correlation peak detected for ME A and ME B was present in all the samples, the formation of correlated droplets mixed with cholesterol crystallites can be present in the systems.

In a previous work, we analyzed a similar system containing surfactant/oil phase/aqueous buffer in the presence of sodium oleate as co-surfactant [2]. An important role of the sodium oleate in the cholesterol crystallization only for the DOX-loaded ME at high O content was found. A strong dependence of the cholesterol crystallite formation with on the co-surfactant presence was also demonstrated [2].

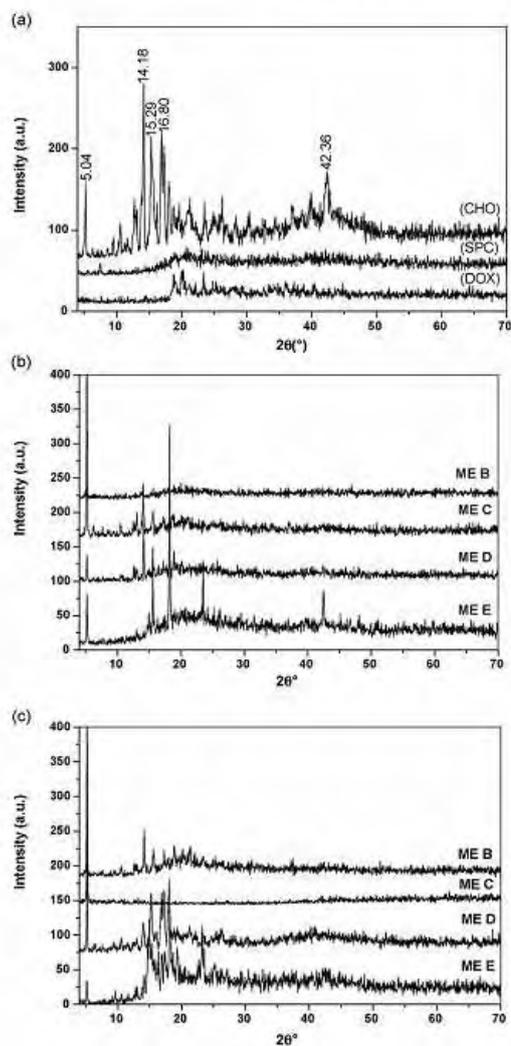


Fig. 4. X-ray diffractograms for pure substances and ME formulations stabilized with SPC/EU. Key: (a) pure substances, (b) DOX-unloaded ME, (c) DOX-loaded ME, cholesterol (CHO); soya phosphatidylcholine (SPC); doxorubicin (DOX) (see Table 1 for ME formulations details).

Only for comparison between the structural variation of the ME systems and the *in vitro* DOX release, a study of the initial DOX release was carried out, without the intention of depleting the ME drug content. The results are shown in Table 3 and Fig. 6. The concentration of the released DOX was linear with the time within the limits of the study. The data were fitted by linear regression and straight lines were obtained with good correlation coefficients.

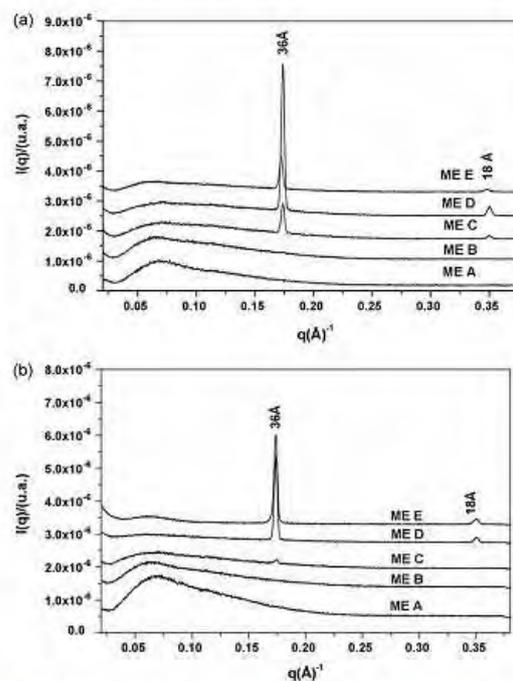


Fig. 5. SAXS analysis for the ME stabilized with SPC/EU. Key: (a) DOX-unloaded ME; (b) DOX-loaded ME (see Table 1 for ME formulations details).

Therefore, it was demonstrated that the incorporation of DOX in the ME systems induced a strong effect on the drug release. The analysis of the results shown in Fig. 6 revealed that the ME A with a low O/S ratio of 0.18 produced an inhibition in its release rate of about 3.4-fold. However, when the ratio of O/S was increased to 0.43, 1.0 and 1.5, the formation of the cholesterol crystallites produced a high inhibition on the rate of DOX release of around 6.2-, 27.8- and 28.1-fold, respectively.

This decrease in the rate of DOX release from the ME systems is probably due to three reasons: (1) the influence of the cholesterol on the wrapping of the phospholipids molecules (SPC) inducing the formation of more organized and rigid structures,

Table 3
Parameters of the best linear fit for the initial DOX release from ME calculated from Fig. 6

Formulation	O/S ratio	Rate constants	Rate constants ratio	r ²
DOX-unloaded	–	3.144	1,000	0.984
ME A	0.176	0.927	0.295	0.969
ME B	0.429	0.506	0.160	0.930
ME C	1.000	0.113	0.036	0.974
ME D	1.500	0.112	0.035	0.985

r²: correlation coefficient.

294

T.P. Formariz et al. / Colloids and Surfaces B: Biointerfaces 63 (2008) 287–295

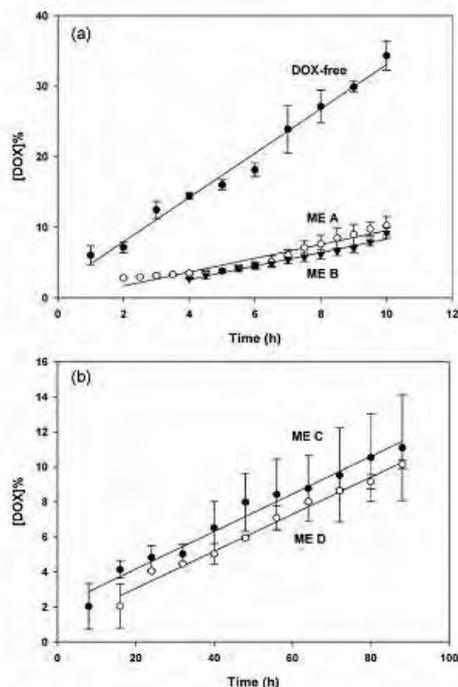


Fig. 6. Drug-release profile of ME stabilized with SPC/EU (see Table 1 for details of ME).

which makes difficult the mobility into the oil core of the ME, decreasing the constant rate of the drug release from the system; (2) the formation of the cholesterol crystals [11,14,15], causing an increase on the retention of the DOX incorporated in the internal phase of ME; (3) the different behavior of the oil droplet diameter caused by the presence of the surfactant, particularly

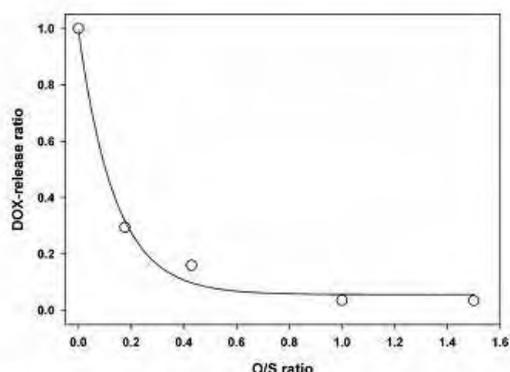


Fig. 7. Effect of the O/S ratio on the DOX release from ME formulations (see Table 1 for details of ME formulations). Solid line calculated from Eq. (3).

by the variation of the O/S ratio that allows to different DOX release ratios (Fig. 7 and Table 3). In addition, it is interesting to note that the *in vivo* behavior of DOX from the microemulsion will certainly be related to the size of the oil droplets and will be able to provide different bioavailability, especially when administered by intravenous route.

These results are in complete agreement with the results from the photon correlation spectroscopy, the apparent viscosity evaluation, the polarized light microscopy, and the SAXS and X-ray diffraction results showing that the modification of the O/S ratio in the ME formation influences the structure of the ME systems, their mechanical properties, and, consequently, the DOX release profiles.

In fact, the data of Fig. 7 shows that the ratio of DOX release ratio followed an single exponential decay (Eq. (3)) when the O/S ratio was increased in the ME formulations. It is possible to verify by the data from Fig. 7 that at a high O/S ratio the ratio of the DOX release reaches a minimum demonstrating the reservoir effect of the oil droplets of the ME.

Thus, for ME E with the highest O contents in the oil/surfactant mixture it was not possible to determine the initial rate release because the DOX was almost entirely restrained inside the oil droplet in the experimental time limits, strongly suggesting the immobilization of the DOX by the cholesterol crystals.

The results presented in this work demonstrate that the rate release of the DOX was extremely dependent on the O/S ratios in the formulations. It was also observed that the produced MEs are able to create either lamellar phase or cholesterol crystals structures.

4. Conclusions

The strong dependence of the surfactants/oil/aqueous phase ratio on the formation of different types of supramolecular aggregates and crystalline species was demonstrated. High O/S ratio leads to the crystallization of cholesterol polymorphs phases which restricts the mobility of the DOX molecules into the ME structure. Excellent agreement between the structural changes and the drug delivery profiles allowed associating the great decrease of DOX rate release to the cholesterol crystallization when higher proportions of the compound were used in the ME formulations.

Acknowledgements

The authors wish to thank FAPESP, CNPq and PADCFAR for the financial support and the National Laboratory of Synchrotron Light-LNLS, Campinas-SP, Brazil, for the SAXS measurements. The authors are also grateful to Glenn Haves, from the University of Georgia, American Language Program, in revising the English text.

References

- [1] T.P. Formariz, M.C.C. Urban, A.A. Silva-Júnior, M.D. Gremião, A.G. Oliveira, Braz. J. Pharm. Sci. 41 (2005) 301.

- [2] T.P. Formariz, L.A. Chiavacci, V.H.V. Sarmiento, C.V. Santilli, E.S.T. Egitto, A.G. Oliveira, *Colloids Surf. B* 60 (2007) 28.
- [3] M.A. Correa, M.V. Scarpa, C.M. Franzini, A.G. Oliveira, *Colloids Surf. B* 43 (2005) 106.
- [4] A.G. Oliveira, M.V. Scarpa, M.A. Correa, L.F.R. Cera, T.P. Formariz, *Quím. Nova* 27 (2004) 138.
- [5] K.G. Holanda-Silva, F.H. Xavier Jr, I.E.G. Farias, J.A. Caldas-Neto, A.K.S. Silva, T. Nakashima Jr, I.B. Araújo, A.G. Oliveira, A.C. Medeiros, E.S.T. Egitto, *J. Basic Appl. Pharm. Sci.* 27 (2006) 21.
- [6] G.G. War, *Colloids Surf. A* 103 (1995) 279.
- [7] T.P. Formariz, V.H.V. Sarmiento, A.A. Silva Jr, M.V. Scarpa, C.V. Santilli, A.G. Oliveira, *Colloids Surf. B* 51 (2006) 61.
- [8] N.H. Gabboun, N.M. Najib, H.G. Ibrahim, S. Assaf, *Int. J. Pharm.* 212 (2001) 73.
- [9] M. Korhonen, J. Hirvonen, L. Peltonen, O. Antikainen, L. Yrjanainen, J. Ylirusti, *Int. J. Pharm.* 269 (2004) 239.
- [10] B. Stidder, G. Fragneto, S.J. Roser, *Langmuir* 21 (2005) 9193.
- [11] C.R. Loomis, G.G. Shipley, D.M. Small, *J. Lipid Res.* 20 (1979) 535.
- [12] L. Brinon, S. Geiger, V. Alard, J. Doucet, J.-T. Tranchant, G. Couarraze, *J. Control Release* 60 (1999) 67.
- [13] S. Ezrahi, A. Ascrin, N. Garti, in: P. Kumar, K.L. Mittal (Eds.), *Handbook of Microemulsion Science and Technology*, Marcel Dekker, New York, 1999 (Chapter 7).
- [14] R.M. Epanã, D. Bach, N. Borochov, E. Wachtel, *Biophys. J.* 78 (2000) 873.
- [15] R.M. Epanã, D. Bach, R.F. Epanã, N. Borochov, E. Wachtel, *Biophys. J.* 81 (2001) 1520.
- [16] E. Farkas, R. Zelkó, G. Török, I. Rácz, S. Marton, *Int. J. Pharm.* 213 (2001) 1.
- [17] S. Mitra, U. Gaur, P.C. Ghosh, N.A. Maitra, *J. Control Release* 74 (2001) 323.
- [18] H.S. Yoo, K.E. Lee, J.E. Oh, T.G. Park, *J. Control Release* 68 (2000) 431.
- [19] A. Miglietta, R. Cavalli, C. Bocca, L. Gabriel, M.R. Gasco, *Int. J. Pharm.* 210 (2000) 67.
- [20] G. Sacco, M. Bigioni, S. Evangelista, C. Goso, S. Manzini, C.A. Maggi, *Eur. J. Pharm.* 414 (2001) 78.
- [21] A. Guinier, *Théorie et Technique de la Radiocristallographie*, Dunod, Paris, 1964 (Chapter 1).
- [22] G. Beaucage, T.A. Ulibarri, E.P. Black, D.W. Schaefer, *Hybrid Organic Inorganic Composites*, American Chemical Society, Washington, 1995 (Chapter 9).
- [23] H.P. Klug, *X-ray Diffraction Procedures*, John Wiley & Sons, New York, 1954 (Chapter 1).
- [24] *The United States Pharmacopeia*, The United States Pharmacopelial Convention, 24th ed., Rockville, 2000, p. 2569.
- [25] M.E. Dalmora, S.L. Dalmora, A.G. Oliveira, *Int. J. Pharm.* 222 (2001) 45.
- [26] H.N. Bhargava, A. Narurkar, L.M. Lieb, *Pharm. Tech.* 3 (1987) 54.
- [27] S. Avramiotis, V. Beckiari, P. Lianos, A. Xenakis, *J. Colloids Interface Sci.* 195 (1997) 331.
- [28] W.K. Kegel, J.T.G. Overbeek, H.N.W. Lekkerkerker, *Thermodynamics of microemulsions I*, in: P. Kumar, K.L. Mittal (Eds.), *Handbook of Microemulsion Science and Technology*, Dekker, Basel, New York, 1999.
- [29] B. Lindman, S.E. Friberg, *Microemulsions—a historical overview*, in: P. Kumar, K.L. Mittal (Eds.), *Handbook of Microemulsion Science and Technology*, Dekker, Basel, New York, 1999.
- [30] S.T. Hyde, *Handbook of Applied Surface and Colloid Chemistry*, John Wiley & Sons, New York, 2001 (Chapter 1).

G Model
COLSUB-3335; No. of Pages 7

ARTICLE IN PRESS

Colloids and Surfaces B: Biointerfaces xxx (2008) xxx–xxx



Contents lists available at ScienceDirect

Colloids and Surfaces B: Biointerfaces

journal homepage: www.elsevier.com/locate/colsurfb



Oil-in-water lecithin-based microemulsions as a potential delivery system for amphotericin B

K.C. Pestana^a, T.P. Formariz^a, C.M. Franzini^a, V.H.V. Sarmiento^b, L.A. Chiavacci^a,
M.V. Scarpa^a, E.S.T. Egito^c, A.G. Oliveira^{a,*}

^a Departamento de Fármacos e Medicamentos, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, UNESP, Rodovia Araraquara-Jaú km 01, 14801-902 Araraquara, SP, Brazil

^b Departamento de Físico-Química, Instituto de Química, UNESP, Rua Francisco Degen, s/n, Quitandinha, 14800-900 Araraquara, SP, Brazil

^c Departamento de Farmácia, Centro de Ciências da Saúde-UFRRN, Rua Gal. Gustavo Cordeiro de Farias s/n, 59010-180 Natal, RN, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 22 March 2008

Received in revised form 25 June 2008

Accepted 27 June 2008

Available online xxx

Keywords:

Microemulsion

Amphotericin B

Drug delivery

Rheology

Phase diagram

ABSTRACT

In this work the structural features of microemulsions (MEs) containing the pharmaceutical biocompatible Soya phosphatidylcholine/Tween 20 (1:1) as surfactant (S), Captex™ 200 as oil phase (O), and phosphate buffer 10 mM, pH 7.2 as aqueous phase (W) were studied. Systems obtained with different proportions of the components were described by pseudo-ternary phase diagrams in order to characterize the microemulsions studied here. MEs were prepared with and without the polyene antifungal drug amphotericin B (AmB). The maximum AmB incorporation into the ME system was dependent on both the oil phase and surfactant proportions with 6.80 and 5.7 mg/mL in high contents, respectively. The incorporation of AmB into the ME systems significantly increased the profile of the droplet size of the ME for all ranges of surfactant proportions used in the formulations. The microstructures of the system were characterized by dynamic light scattering (DLS) and rheological behavior. The DLS results showed that the size of the oil droplets increases 4.6-fold when AmB is incorporated into the ME system. In all cases the increase in the proportion of the oil phase of the ME leads to a slight increase in the diameter of the oil droplets of the system. Furthermore, for both the AmB-loaded and AmB-unloaded MEs, the size of the oil droplets decrease significantly with the increase of the S proportion in the formulations, demonstrating the efficiency of the surfactant in stabilizing the ME. Depending on the ME composition, an anti-thixotropic behavior was found. The maximum increases of the consistency index caused by the increase of the oil phase of the ME were of 17- and 25-times for the drug-loaded and drug-unloaded MEs, respectively. However, the observed effect for the drug-loaded ME was about 4.6 times higher than that for the drug-unloaded one, demonstrating the strong effect of the drug on the rheological characteristics of the ME system. Therefore, it is possible to conclude that the investigated ME can be used as a very promising vehicle for AmB.

© 2008 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Invasive fungal infections are an important cause of morbidity and mortality among immunodeficient patients (transplants, chemotherapy, AIDS) [1–3]. Amphotericin B (AmB), 3-(4-amino-3,5-dihydroxy-6-methyl-oxan-2-yl)oxy-19,25,27,30, 31,33, 35,37-octahydroxy-18,20,21-trimethyl-23-oxo-22,39-dioxabicyclo [33.3.1] nonatriaconta-4,6,8,10,12,14,16-heptan-38-carboxylic acid (Fig. 1), a broad spectrum antifungal agent mainly used for the treatment of invasive fungal infections [4–6], acts on the ergosterol, a steroid present in the membrane of the fungal cells by increasing

its permeability, which promotes an ion influx into the parasite, thus leading to its death [7,8]. This molecule has the broadest spectrum of activity of all available antifungal agents [9].

The high toxicity of AmB in its conventional formulation, a micellar desoxycholate (D-AmB), has been successfully prevented in other types of AmB formulations [10,11]. The novel lipid-containing formulations of AmB (i.e. liposomes, microemulsions) have been developed in an attempt to decrease its nephrotoxicity and increase its potential therapeutic effect [5].

Colloidal systems, such as microemulsions (MEs), have been investigated as drug delivery and targeting, since these systems can incorporate drug compounds modifying their bioavailability and stability and reducing their side effects [12,13]. These structures have considerably been investigated as drug delivery systems and have also been used to dissolve water-insoluble drugs in

* Corresponding author. Tel.: +55 16 3301 6974; fax: +55 16 3301 6980.
E-mail address: oliveia@fcar.unesp.br (A.G. Oliveira).

0927-7755/\$ – see front matter © 2008 Elsevier B.V. All rights reserved.
doi:10.1016/j.colsurfb.2008.06.016

Please cite this article in press as: K.C. Pestana, et al., Oil-in-water lecithin-based microemulsions as a potential delivery system for amphotericin B, *Colloids Surf. B: Biointerfaces* (2008), doi:10.1016/j.colsurfb.2008.06.016

G Model
COLSUB-3335; No. of Pages 7

ARTICLE IN PRESS

2

K.C. Pestana et al. / Colloids and Surfaces B: Biointerfaces xxx (2008) xxx–xxx

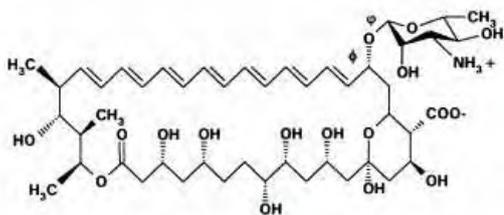


Fig. 1. Chemical structure of AmB.

aqueous medium or water-soluble drugs in lipophilic medium [14]. An ME is a system which contains water and oil coexisting in thermodynamic equilibrium due to the presence of a surfactant film at the oil–water interface [15–17]. It is formed spontaneously and exhibits typical physicochemical properties, such as optical transparency and isotropy, a wide range of viscosity and thermodynamic stability [15,18]. Usually, the system contains surfactants and cosurfactants to achieve the low interfacial tension and required packing parameters [19]. MEs differ from conventional emulsions not only by their much smaller structural size but also by their thermodynamic stability [20].

Modifications in the composition of the ME can promote changes in its structural features and consequently in its mechanical behavior and may constrain the extent of mobility and direction of the movement of the molecules dissolved in such systems [15,21]. It is known that less ordered microemulsion systems usually have reduced viscosity, while the more ordered hexagonal and cubic phases show the elastic properties of solids. As the mobility of molecules is higher in liquid than in solid systems, such structural modifications can raise the rate and the profile of drug delivery [14,21].

In this work, an ME stabilized by the mixture of phosphatidylcholine and neutral polysorbate hydrophilic surfactant was studied. The systems were characterized in a pseudo-ternary phase diagram. The diameter distribution of the oil phase was analyzed in relation to the used surfactant and oil phase contents. Rheological studies were performed by controlled-stress rheological analysis. The variation of the droplet diameter and rheological properties were studied in the presence and absence of AmB incorporated into the ME system.

2. Materials and methods

2.1. Materials

Soya phosphatidylcholine (SPC), (Epikuron 200™) was purchased from Degussa Texturants Systems Deutschland GmbH & Co. (Hamburg, Germany); amphotericin B powder, lot 596/07, was kindly provided by Cristalia, Brazil. Captex 200™ (propylene glycol dicaprylate/dicaprate) (O) was kindly provided by Abitec Corporation, (Janesville, USA). Phosphoric acid P.A. and polyoxyethylenesorbitan monolaurate (Tween 20) (Tw) were from Sigma Chemical Co. (Saint Louis, USA). Water was purified in a Milli Q Plus system (Millipore) and its resistivity was 18.2 MΩ cm. All other solvents and chemicals were of analytical grade.

2.2. Methods

2.2.1. Pseudo-ternary phase diagram

The appropriated proportions of SPC/Tw for the surfactant mixture (S) were previously established in this study as 1:1 (w/w), and thus the surfactant mixture provided a sufficiently clear system

conceptually consistent with the ME structure. Captex 200™ (O) was added to the semisolid mixture of SPC/Tw (S) in suitable ratios from 1:9 to 9:1 (w/w) to obtain the phase diagram. To the constantly stirred semisolid mixture (1.0 g), containing S and O, the aqueous phase (W) was slowly added with a precision burette. The transitions from semisolid mixture to optically clear ME and then from clear ME to translucent colloidal ME were sharp and reproducible to within 0.05 mL of W. The titrations were carried out in a controlled-temperature room at 25 ± 0.1 °C. MEs were prepared 4 h before the experiments and maintained at 25 ± 0.1 °C to allow the system to reach complete equilibrium.

2.2.2. Microemulsion preparation

Selected weights of SPC and Tw were mixed to obtain S. To the semisolid mixture of SPC/Tw, an appropriate amount of O was added. To the constantly stirred mixture containing S and O, the aqueous phase was slowly added. This additional sequence enabled the homogenization of the surfactant. Subsequently, the system was maintained under agitation using a 220-W Ultrasonic Liquid Processor, model XL 2020 (USA), operating in a discontinuous mode, for 20 min at room temperature. The mixture was left for 10 min in a thermostatic chamber at 25 ± 0.1 °C. The samples were centrifuged at $8500 \times g$ in an Ultracentrifuge Hitachi Himac CP-80 (Japan) for 15 min, to eliminate the titanium residues that could be released from the sonicator tip. The appropriated amounts of AmB were dissolved directly in the microemulsion (ME) previously prepared. The formulations used in this work are described in Table 1 and characterized in Fig. 2.

2.2.3. Maximum incorporation of AmB into microemulsion

Microemulsions containing SPC/Tw (S), CP(O), and buffer phosphate 10 mM pH 7.2 (W) were prepared in triplicate (Table 1). Three milliliters of the ME were transferred to the sonication tube. An excess of AmB was added, and the system was submitted to a tip ultra-sound vibration for 20 min. After sonication, the mixture was left for 10 min in the thermostatic chamber at 25 ± 0.1 °C. The MEs were centrifuged at $8500 \times g$ in a Hitachi Himac CP-80 Ultracentrifuge (USA) for 15 min to remove the drug excess. The supernatant was recovered and carefully filtered using a $0.45 \mu\text{m}$ membrane. The filtrate was diluted and dissolved in methanol for the quantitative analysis of the AmB by HPLC.

2.2.4. Quantitative analysis of AmB

The AmB was analyzed by HPLC using a Chromatograph Waters® Alliance (USA) with automatic sample injector and Symmetry® C18 column $150 \text{ mm} \times 4.0 \text{ mm}$ with a $5 \mu\text{m}$ particle size. The mobile phase was acetonitrile:EDTA 25 mM in a gradient mode (from 35:65 to 70:30 (v/v)), with a flow rate of 0.4 mL min^{-1} , a column temperature of 25 °C, rheodyne injector with $100 \mu\text{L}$ loop, and UV-vis detector at 410 nm.

2.2.5. Dynamic light scattering (DLS)

The particle size analysis was carried out using a dynamic light scattering (DLS) apparatus (Brookhaven Instruments Corporation, EMI 9863 model (USA) with laser source He–Ne 10 mW, 532 nm-HUGHES, self-correlator, 64 channels). Before analysis the samples

Table 1
Composition of the ME formulations

ME composition (w/w) (%)	ME A	ME B	ME C	ME D	ME E	ME F	ME G
SPC/Tw (1:1) (S)	20	20	20	20	10	15	25
CP (O)	3	6	10	17	10	10	10
Aqueous phase (W)	77	74	70	63	80	75	65

See Fig. 2 for phase diagram location.

Please cite this article in press as: K.C. Pestana, et al., Oil-in-water lecithin-based microemulsions as a potential delivery system for amphotericin B, Colloids Surf. B: Biointerfaces (2008), doi:10.1016/j.colsurfb.2008.06.016

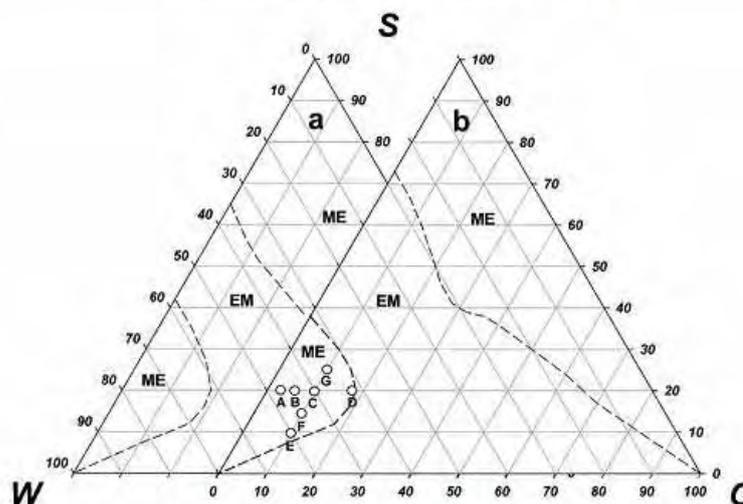


Fig. 2. Pseudo-ternary phase diagram for the system containing SPC/Tw (S), Caprex™ (O), and aqueous buffer (W). Key: (a) AmB-unloaded ME, (b) AmB-loaded ME, (ME) microemulsion, (EM) emulsion and (○) specific compositions of the studied MEs, 25 °C. See Table 1 for ME formulation details.

were diluted with buffer phosphate 10 mM pH 7.2 and filtered (0.22 μm). The size measurements were carried out at fixed angle of 90°. The correlator was operated in parallel mode and the cumulant method of analysis was used to calculate the mean sample size according to the intensity of scattered light (Z —average diameter). The results are the mean and standard deviation (S.D.) of at least 10 measurements of the samples. The measurements were performed at 25 ± 0.2 °C.

2.2.6. Rheological measurements

The rheological properties of drug-loaded and drug-unloaded MEs were determined using a controlled-stress Carrimed CSL 100 rheometer (TA instruments) with cone-plate geometry. The cone-plate geometry is a 2° stainless steel cone with a 4 cm diameter and a gap of 55 μm between the cone and plate. The experiments were performed with a shear rate ($\dot{\gamma}$) in the range of 0–400 s⁻¹. The used shear rate regions were selected due to the resisting abilities against the applied stresses. The rheological measurements were performed for both up and down curves. The data of the shear cycle were fitted to the power-law model using the Rheology Solutions Software (version Data V1.1.7, TA instruments). All rheological determinations were carried out in triplicate for all samples and at 25.0 ± 0.2 °C.

3. Results and discussions

The pseudo-ternary phase diagram that describes the experimental conditions in which the components must be combined to form clear preparations is of relevance to characterization of ME systems. For the MEs stabilized with SPC/Tw, the pseudo-ternary phase diagram (Fig. 2) describes the wide range of possibilities to obtain domain regions of clear systems in the phase diagram where O/W microemulsions prevail. The surfactant used in this work was selected from previous studies with initial ME formulations containing various SPC/Tw mixtures providing a different hydrophilic–lipophilic balance (HLB). The HLB describes the simultaneous attraction of the surfactant mixture for the oil and aqueous

phases. When it is similar to the required HLB of the ME oil phase, the system provides the minimum energy condition for ME formation. The composition of the surfactant system SPC/Tw 1:1 (w/w) was established in order to obtain the HLB value to provide the dearest system used in the pseudo-ternary phase diagram. This condition serves to optimize the solvation requirements of the surfactant and minimizes the free energy of the overall system. When SPC/Tw surfactant was incorporated into the immiscible mixture of O and aqueous buffer (W), the surfactant molecules could be located in the oil–water interface, which is thermodynamically very favorable to stabilizing the ME system.

For the system containing AmB, a very similar domain region for oil-in-water ME was obtained in the phase diagram (Fig. 2). In this particular region of interest, the ME formulations were selected in order to obtain oil-in-water systems. Although the phase diagram described in Fig. 2 is shown here with only the intention to illustrate the ME region used in this study, the results were very interesting because they reveal that the ME exists at infinite dilution in water. The points A–D shown in Fig. 2 represent the specific composition of the formulations ranging up to the oil phase proportion. On the other hand, the points E–G represent the variations in the surfactant proportion.

The data of the pseudo-ternary phase diagram (Fig. 2) shows that it is possible to add a great volume of the aqueous phase and a limited volume of the oil phase maintaining the thermodynamic stability of the O/W systems. For both with and without AmB, the O/W microemulsion region in the pseudo-ternary phase diagram was verified within the limit of 20% of the oil phase. After the system becomes opaque with transition to conventional emulsion, the distinct transition from emulsion (EM) to ME could be observed. In the presence of AmB, the area of the ME begins to appear with approximately 60% of the aqueous phase (Fig. 2).

In the presence of AmB, the area of EM (Fig. 2a) is greater than that observed in the absence of the drug (Fig. 2a–b). Depending on the oil phase contents, a minimum of about 25% of the aqueous phase was necessary to form the conventional EM phases. MEs with high oil content were identified in the region of 0–25% of the aqueous

G Model
COLSUB-3335; No. of Pages 7

ARTICLE IN PRESS

4

K.C. Pestana et al. / Colloids and Surfaces B: Biointerfaces xxx (2008) xxx–xxx

ous phase proportions. Additionally, this was observed not only in the presence of AmB but also in the range of 0–35% in its absence. In the pseudo-ternary phase diagrams with and without AmB, the W/O ME allows the infinite dilution with the oily phase maintaining its thermodynamic stability (Fig. 2).

MEs systems are presented on both sides of the pseudo-ternary phase diagram (Fig. 2) showing oil-in-water and water-in-oil ME systems mutually separated by an opaque transition region with greater internal microstructure, but that can be changed into either of the systems depending on the component proportions. Thus, when the oil phase proportion was increased, the system became cloudy, indicating a change in the internal microstructure. In fact, rheological measurements show that when the oil phase proportion increases together with the decrease of the surfactant amount, the apparent viscosity of these systems increases, indicating the microstructure modifications.

The remainder region of the phase diagram represented by opaque systems (EM) involves the conventional emulsions. Furthermore, we have found that in the interest region of the phase diagram, which represents W/O ME with high content of the aqueous phase, the incorporation of AmB did not induce significant changes in the phase diagram region of ME–AmB (Fig. 2). The systems remained isotropic and optically transparent and, after $8500 \times g$ centrifugation for 15 min, no phase separation or solid sediment was observed. Thus, the stabilization of the system with SPC/Tw provides the best condition to reduce the interfacial tension and to allow the formation of the smallest possible size of the internal phase to obtain optically clear systems [22–25].

Light scattering is a routine technique to determine the diameter of the internal phase of MEs. The light scattering measures were made for liquid MEs, which were diluted with aqueous buffer in order to detect experimental errors [26]. The diameters of the oil droplets are shown in Figs. 3 and 4.

The data showed to be dependent on the ratio of surfactant (Fig. 3) and oil phase (Fig. 4) in the ME formulations. We can verify that for both drug-loaded and drug-unloaded ME the diameters of the structures decrease with the concentration of surfactant (Figs. 3 and 4).

For AmB-loaded ME we found that when the S proportion increased, its mean droplet size diameter decreased from 205 to 82 nm (Fig. 3). This occurred slowly in smaller proportions of S, and sharply between 20% and 25% of S. The abrupt reduction

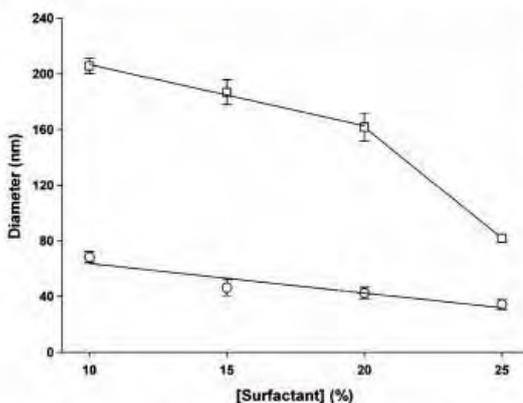


Fig. 3. Effect of the surfactant proportion on the diameter. Key: (□) AmB-loaded ME and (○) AmB-unloaded ME, 25 °C. See Table 1 for formulation details, 25 °C.

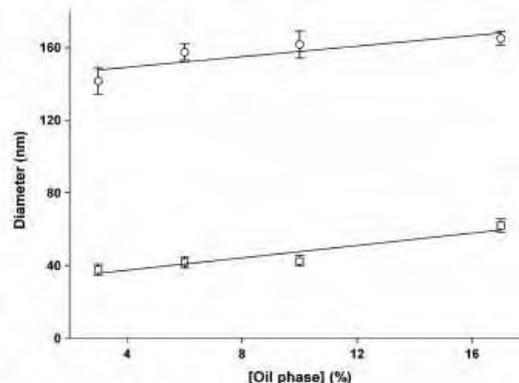


Fig. 4. Effect of the oil phase on the diameter of the ME. Key: (○) AmB-loaded ME and (□) AmB-unloaded ME. See Table 1 for formulation details, 25 °C.

verified in the final range of S contents can be related to an additional dissolution of AmB fraction from the oil–water interface caused by the excess of the surfactant in the bulk of the dispersion medium.

For drug-unloaded ME, the mean droplet size diameter was about 3.0-fold lower than that for AmB-loaded ME with low S content. The results show a linear dependence with little slope by the effect of the S proportion (Fig. 3). The decrease of the mean diameter of the droplets was from 68.3 to 34.1 nm, in the range of 10–25% of S, respectively. The decrease in droplet size diameter allowing the formation of clear to semi-transparent systems, demonstrating the good effect of the 1:1 (w/w) SPC/Tw ratio in the reduction of the interfacial tension for the ME stabilization [22–23]. This profile can be explained since the surfactant organizes as a monolayer at the oil–water interface reaching saturation in high proportions and leading to minimum droplet size diameters [13,27].

The change of the hydrodynamic diameter of the oil droplets as a function of the oil ratio is shown in Fig. 4.

Since the experimental data were obtained with a fixed proportion of S (20%), the droplet size diameter values achieved in the low oil phase content were about 141.6 and 37.7 nm, for the drug-loaded and unloaded ME, respectively. It was shown that the oil phase has little effect on the mean droplet size diameter. This profile shows that the S proportion was sufficient to cover the entire oil–water interface and provide a thermodynamically stable system.

Therefore, we have found that the AmB incorporation into the ME modified the droplet size diameter profile of the internal oil phase of the ME. For both the surfactant and oil phase, the effect on the mean droplet size diameter profile of the AmB-loaded ME was more pronounced in all ranges of component proportions (Figs. 3 and 4). One hypothesis to explain the biggest diameters of the oil droplets when AmB was incorporated into the ME system is related to the hydrophobic property of the AmB molecule in the studied pH region. Besides, since the pK_a value of the amino group of AmB was taken as 5.7 for $-\text{COOH}$ and 10.0 for $-\text{NH}_2$, under the experimental conditions (pH 7.2), the AmB is amphoteric and very slightly water soluble, and then can be favorably partitioned into the oil phase. In this condition the AmB can be considered as an additional fraction of the oil phase added to the ME system, increasing the droplet volume. Moreover, as the AmB molecule also exhibits amphiphilic properties, a fraction of the drug molecules can incorporate as a spacer into the surfactant monolayer at the oil–water interface, leading to an increase in droplet

Please cite this article in press as: K.C. Pestana, et al., Oil-in-water lecithin-based microemulsions as a potential delivery system for amphotericin B, Colloids Surf. B: Biointerfaces (2008), doi:10.1016/j.colsurfb.2008.06.016

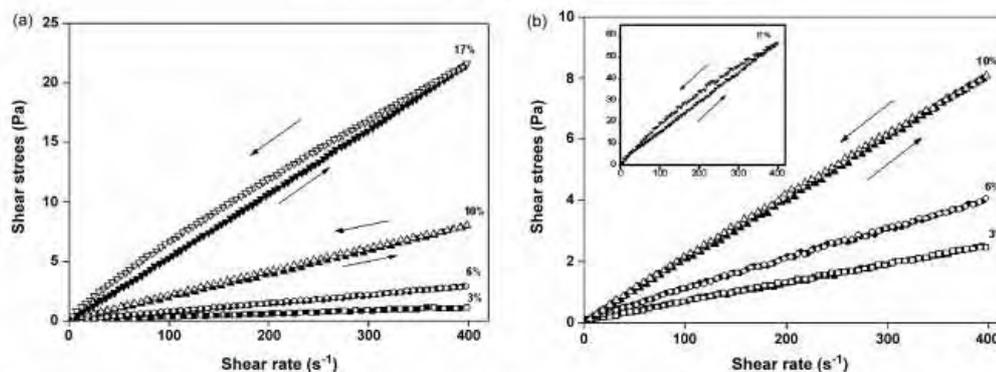


Fig. 5. Rheological behavior of the ME stabilized with SPC/Tw in function of the oil phase. (See Table 1 for formulation details). Key: (a) AmB-unloaded ME and (b) AmB-loaded ME.

size. Thus, these phenomena can explain the parallel shift between AmB-unloaded and AmB-loaded ME data observed in Fig. 4.

The data in Figs. 5 and 6 show the rheological profile of the samples and correlate the shear stress (τ) and the shear rate ($\dot{\gamma}$) relationships. The response of the anti-thixotropic properties of the ME to stepwise changes of shear rate is shown in Fig. 5a–b.

It was found that for both drug-loaded and drug-unloaded MEs this property decreased with the increase of the oil phase proportion in the system. The addition of AmB to the ME system has a little effect on this property. The results in Fig. 5 demonstrate that the thixotropic ME becomes more mobile with the stirring.

The results of the surfactant effect on rheological behavior of drug-loaded and drug-unloaded MEs are shown in Fig. 6a–b.

The flow curves revealed that the majority of the ME systems showed a non-linear relationship between the shear stress (τ) and shear rate ($\dot{\gamma}$), which is characteristic of a non-Newtonian fluid material. It was verified that the anti-thixotropic response was very similar to that observed for the oil phase (Fig. 6a–b). In fact, the flow curves revealed that, especially in high S and O contents, the ME systems showed a non-linear relationship between the shear stress and the shear rate, exhibiting a non-Newtonian profile. In this case the viscosity is dependent on the shear rate, pressure, temperature, and time [28]. Because of these properties, the systems behave as

pseudoplastic ones, and a power-law model can be used to describe the flow characteristics of the MEs. Thus, the flow behavior can be described by the Eq. (1) [29]:

$$\tau = k(\dot{\gamma})^n \quad (1)$$

where k is a constant parameter related to the viscosity (consistency index) and n is the flow behavior index. In this model $n > 1$ represents a dilatant fluid, $n < 1$ represents a pseudoplastic fluid, and Newtonian fluids have an n value of unity.

In general, the changes in the material caused by the shearing process increase the apparent viscosity under the shear stress. However, the structure is gradually recovered when the stress is removed [30,31]. On the other hand, the results of our system showed that despite the rheological curves showing a decrease of the viscosity, a more ordered arrangement was observed after the shearing process, typical behavior of anti-thixotropic systems.

This is a desired property in pharmaceutical dispersions as ME, especially for pseudoplastic systems, because the decrease of the viscosity facilitates not only the drug administration but also the ME preparation. Moreover, the more ordered system formed after the shearing process may be responsible to prolong or modify the drug release profile. For the AmB-unloaded ME, the thixotropic behavior was negligible, highlighting the AmB role in the ME weak

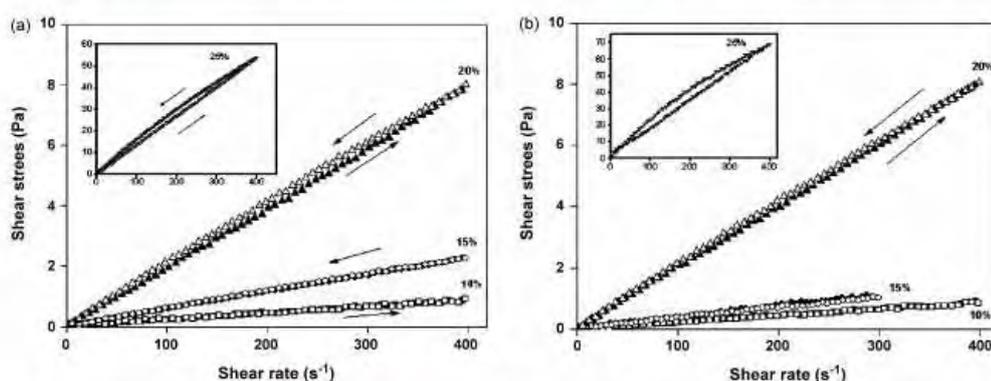


Fig. 6. Rheological behavior of the ME stabilized with SPC/Tw in function of surfactant ratio. Key: (a) AmB-unloaded ME and (b) AmB-loaded ME. See Table 1 for formulation details.

Please cite this article in press as: K.C. Pestana, et al., Oil-in-water lecithin-based microemulsions as a potential delivery system for amphotericin B, Colloids Surf. B: Biointerfaces (2008), doi:10.1016/j.colsurfb.2008.06.016

G Model

COLSUB-3335; No. of Pages 7

ARTICLE IN PRESS

6

K.C. Pestana et al. / Colloids and Surfaces B: Biointerfaces xxx (2008) xxx–xxx

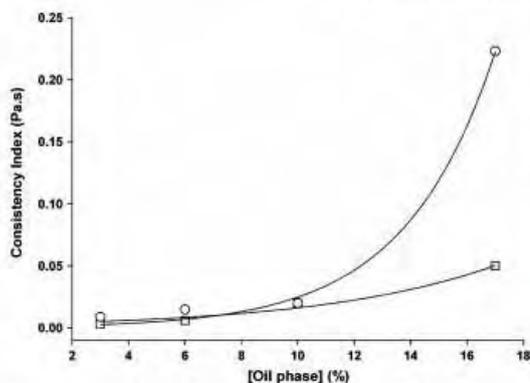


Fig. 7. Consistency index of the ME stabilized with SPC/Tw in function of the oil phase content. Key: (○) AmB-loaded ME and (□) AmB-unloaded ME. See Table 1 for formulation details, 25 °C.

thixotropy. It is known that the thixotropic property progressively breaks down on shearing and slowly rebuilds more organized arrangements at rest for a time period [32,33]. Furthermore, these results show that the addition of AmB to the ME system does not cause interactions between the dispersed droplets. In this case the decrease in the shear rate during the rheology analysis induces the formation of new structures which temporarily decrease the viscosity, providing conditions for the existence of thixotropy.

The apparent viscosity of the ME is directly related to the consistency index that is measured directly from the slope of the rheological curves. Figs. 7 and 8 show that for both the AmB-loaded and AmB-unloaded MEs, the values of the consistency index varied slightly in low proportions of O and S. The AmB incorporation into the ME led to a sharp rise in its consistency index in high proportions of O compared with the empty ME. This phenomenon is in agreement with the results of Figs. 3–4, showing a significant contribution of AmB in increasing the diameter of the droplets of the internal phase ME.

In addition, the effect of the S content on the modification of the consistency index discloses that the profile also leads to an increase in this parameter when compared with the empty

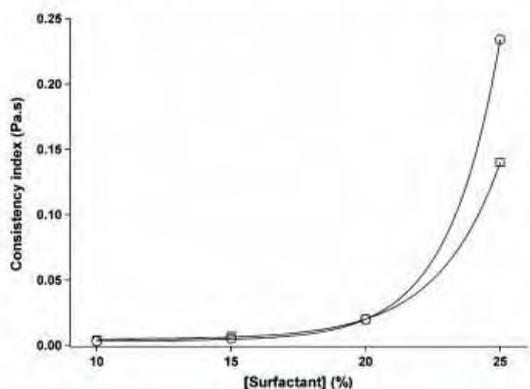


Fig. 8. Consistency index of the ME stabilized with SPC/Tw in function of surfactant ratio. Key: (○) AmB-loaded ME and (□) AmB-unloaded ME. See Table 1 for formulation details, 25 °C.

ME (Figs. 7 and 8). This effect can be explained since the interaction of AmB with the oil droplets provokes the formation of more voluminous microstructures, which are reflected directly in the consistency index. In fact, the light scattering analysis showed larger diameters for the internal oil droplets when AmB was incorporated into the ME (Figs. 3 and 4). Also, it is well known that the increase of the oil phase and surfactant contents leads to an enhancement of the consistency index [33,34].

In this work all the n determined values were less than unities, indicating that these systems behave as pseudoplastic shear-thinning fluids. This behavior is due to the orientation of droplets towards the flow caused by shearing of the system. In these conditions, the consistency index is strongly influenced by the size of the droplets [35]. For both the AmB-loaded and AmB-unloaded MEs, the values of the consistency index increase about 18- and 25-fold with the oil phase proportion, respectively.

The variation of the consistency index (Figs. 7 and 8) verified in our results could be due to the properties of the oil phase and also to the modifications achieved on the diameter of the oil droplets. For diluted ME systems, the oil droplets were scarce and have no or little effect on the viscosity. But when the diameter increases, or the number of droplets increases per unity of volume, the droplet–droplet interactions become predominant and then the frictional effects can lead to the consistency index increase.

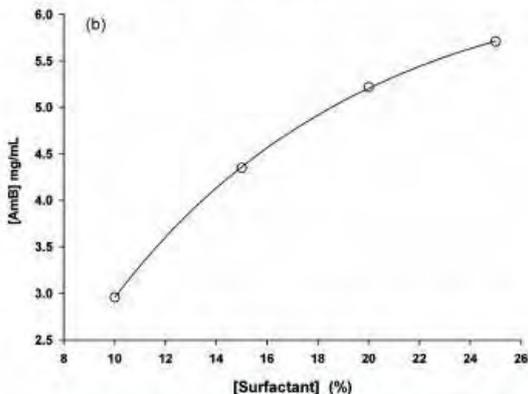
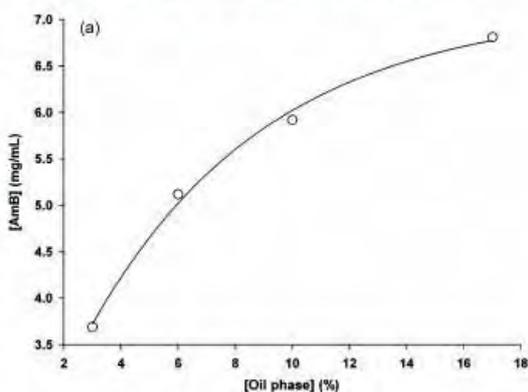


Fig. 9. Incorporation of the AmB in the microemulsion system. (a) Effect of the oil phase and (b) effect of the surfactant contents. See Table 1 for formulation details, 25 °C.

Please cite this article in press as: K.C. Pestana, et al., Oil-in-water lecithin-based microemulsions as a potential delivery system for amphotericin B, Colloids Surf. B: Biointerfaces (2008), doi:10.1016/j.colsurfb.2008.06.016

G Model

COLSUB-3335; No. of Pages 7

ARTICLE IN PRESS

K.C. Pestana et al. / Colloids and Surfaces B: Biointerfaces xxx (2008) xxx–xxx

7

Since in the experimental conditions the water solubility of AmB can be considered negligible, we have verified the effect of the proportions of the oil phase and the surfactant proportions on the solubility of the drug. The results of the association of AmB to ME, the effect of the oil phase proportions and the surfactant contents are shown in the solubility diagram of Fig. 9a–b.

The concentration of the dissolved AmB was remarkably increased by the addition of the oil phase (Fig. 9a) and surfactant (Fig. 9b), increasing probably up to a plateau in high proportions of these components. These features clearly demonstrate that AmB interacts strongly with the internal phase of the ME system through a hydrophobic effect. This rate of AmB association to ME is typical of the neutral drugs incorporation into supramolecular aggregates as micelles and microemulsions [36–38]. In fact, since the pK_a values of AmB were 5.2 and 10.0 for the carboxylate and amino groups, respectively, at the experimental pH region AmB is an amphoteric compound, and then it is formally neutral and may interact with microemulsion aggregates through hydrophobic effect, associating predominantly into the oil phase.

Furthermore, since this ME system also exhibited great physical stability, we could rationalize the most appropriate ME formulation for incorporation of AmB. We found that in the range of the experimental conditions, the maximum incorporation of AmB into the ME system was about 6.80 mg/mL of the ME. This is a quite sufficient concentration, higher than the required dose for use in antifungal therapy, which is 5 mg/mL. Thus, the aqueous solubility of AmB was significantly increased by association with neutral MEs which offer many promising features for their possible widespread use as a vehicle for AmB administration.

4. Conclusions

The results of this work show that it is possible to obtain oil-in-water and water-in-oil microemulsions stabilized by mixed surfactant SPC/Tw. The pseudo-ternary phase diagram demonstrates that clear systems such as oil-in-water microemulsions exist in a defined region of high water contents and that the increase in the oil phase leads to the formation from a transition region to a conventional emulsion region followed by a water-in-oil microemulsion. The O/W ME system of interest was thermodynamically stable, appropriate from the rheological point of view and from its droplet size distribution. Since it also allowed the incorporation of appropriate AmB concentrations for therapeutic administration, we can conclude that the investigated ME system can be a promising vehicle as a new drug-carrier for AmB.

Acknowledgements

The authors wish to thank FAPESP, CNPq, and CAPES for their financial support and Glenn Hawes, from the American Language Program of the University of Georgia, for editing this manuscript.

References

- [1] G. Petrikos, A. Skiada, *Int. J. Antimicrob. Agents* 30 (2007) 108.
- [2] J. Pemán, M. Boscha, E. Cantón, A. Viudes, I. Jaques, M. Gómez-García, J.M. García-Martínez, M. Gobernado, *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 60 (2008) 109.
- [3] P.L. Shao, L.M. Huang, P.R. Hsueh, *Int. J. Antimicrob. Agents* 30 (2007) 487.
- [4] E. Esposito, F. Bortolotti, E. Menegatti, R. Cortesi, *Int. J. Pharm.* 260 (2003) 249.
- [5] B.K. Yoo, M.A.J. Miah, E.S. Lee, K. Han, *Biol. Pharm. Bull.* 29 (2006) 1700.
- [6] B. Brime, P. Frutos, P. Brings, A. Nieto, M.P. Ballesteros, G. Frutos, *J. Antimicrob. Chemother.* 52 (2003) 103.
- [7] N. Lincopana, P. Borell, R. Fockb, E.M. Mamizukab, A.M. Carmona-Ribeiro, *Exp. Toxicol. Pathol.* 58 (176) (2008) 175.
- [8] V.S. Amato, F.F. Tuon, H.A. Becha, V. Amato Neto, A.C. Nicodemo, *Acta Trop.* 105 (2008) 1.
- [9] C. Cordonnier, M. Mohry, C. Faucher, C. Pautas, M. Robin, N. Vey, F. Monchecourt, L. Mahi, P. Ribaud, *Int. J. Antimicrob. Agents* 31 (2008) 135.
- [10] J.W. Lee, M.E. Petersen, P. Lin, D. Dressler, I. Bekersky, *Ther. Drug Monit.* 23 (2001) 268.
- [11] B. Brime, G. Molero, P. Frutos, G. Frutos, *Eur. J. Pharm. Sci.* 22 (2004) 451.
- [12] T.P. Formariz, M.C.C. Urban, A.A. Silva-Júnior, M.D. Gremião, A.G. Oliveira, *Braz. J. Pharm. Sci.* 41 (2005) 301.
- [13] T.P. Formariz, V.H.V. Sarmento, A.A. Silva-Júnior, M.V. Scarpa, C.V. Santilli, A.G. Oliveira, *Colloids Surf. B* 51 (2006) 61.
- [14] M.A. Correa, M.V. Scarpa, C.M. Franzini, A.G. Oliveira, *Colloids Surf. B* 43 (2005) 106.
- [15] A.G. Oliveira, M.V. Scarpa, M.A. Correa, L.F.R. Cera, T.P. Formariz, *Química Nova* 27 (2004) 138.
- [16] E.J. Acosta, T. Nguyen, A. Witthayapanyanon, J.H. Harwell, D.A. Sabatini, *Environ. Sci. Technol.* 39 (2005) 1275.
- [17] J.S. Yuan, M. Ansari, M. Samaan, E.J. Acosta, *Int. J. Pharm.* 349 (2008) 130.
- [18] M.A. Polizelli, A.L. Santos, E. Feitosa, *Colloids Surf. A* 315 (2008) 130.
- [19] D. Libster, A. Aserin, N. Gatti, *J. Colloid Interface Sci.* 302 (2006) 322.
- [20] M. Gradzielski, *Curr Opin. Colloid Interface Sci.* 13 (2008) 263.
- [21] T.P. Formariz, L.A. Chiavacci, V.H.V. Sarmento, C.V. Santilli, E.S.T. Egitto, A.G. Oliveira, *Colloids Surf. B* 60 (2007) 28.
- [22] S. Avramiotis, V. Beckiarl, P. Lianos, A. Xenaskis, *J. Colloid Interface Sci.* 195 (1997) 331.
- [23] H.N. Bhargava, A. Narurkar, L.M. Lieb, *Pharm. Tech.* 3 (1987) 54.
- [24] W.K. Kegel, J.T.G. Overbeek, H.N.W. Lekkerkerker, *Thermodynamics of microemulsions*, I, in: P. Kumar, K.L. Mittal (Eds.), *Handbook of Microemulsion Science and Technology*, Dekker, Basel, New York, 1999.
- [25] B. Lindman, S.E. Friberg, *Microemulsions—a historical overview*, in: P. Kumar, K.L. Mittal (Eds.), *Handbook of Microemulsion Science and Technology*, Dekker, Basel, New York, 1999.
- [26] D. Orthaber, O. Glatter, *Chem. Phys. Lipids* 107 (2000) 189.
- [27] T.P. Formariz, L.A. Chiavacci, V.H.V. Sarmento, C.M. Franzini, A.A. Silva-Jr., M.V. Scarpa, C.V. Santilli, E.S.T. Egitto, A.G. Oliveira, *Colloids Surf. B* 63 (2008) 287.
- [28] H.V. Atkinson, *Prog. Mater. Sci.* 50 (2005) 341.
- [29] Z.Q. Chen, Z.G. Dai, *Colloid Chemistry*, Higher Education Press, Beijing, China, 1984.
- [30] A. Martin, *Physical Pharmacy*, 4th ed., Lea & Febiger, Philadelphia, 1993.
- [31] H.A. Barnes, *J. Non-Newton Fluid Mech.* 70 (1997) 1.
- [32] H.A. Barnes, *Colloids Surf. A* 91 (1994) 89.
- [33] M.T. Channam, M.N. Esmail, *J. Appl. Polym. Sci.* 64 (1997) 289.
- [34] J.L. Salager, in: F. Niallout, G. Marti-Mestres (Eds.), *Pharmaceutical Emulsions and Suspensions*, Marcel Dekker, New York, 2000, Chapter 3.
- [35] R. Pal, *J. Colloid Interface Sci.* 225 (2000) 359.
- [36] A.G. Oliveira, M. Nothenberg, I.M. Cuccovia, H. Chaimovich, *J. Phys. Org. Chem.* 4 (1991) 19.
- [37] A.G. Oliveira, M.V. Scarpa, H. Chaimovich, *J. Pharm. Sci.* 86 (1997) 616.
- [38] M.E.D. Dalmora, A.G. Oliveira, *Int. J. Pharm.* 184 (1999) 157.

Please cite this article in press as: K.C. Pestana, et al., Oil-in-water lecithin-based microemulsions as a potential delivery system for amphotericin B, *Colloids Surf. B: Biointerfaces* (2008), doi:10.1016/j.colsurfb.2008.06.016

8.2 PARECER COMITÊ DE ÉTICA

unesp		UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA "JÚLIO DE MESQUITA FILHO" Câmpus de Araraquara	
--------------	-----------------------------------------------------------------------------------	---------------------------------------------------------------------------------------------------	-------------------------------------------------------------------------------------

Protocolo CEP/FCF/CAr. nº 31/2005 – Animais em Pesquisa
Interessado: THALITA PEDRONI FORMARIZ
Orientador: Prof. Dr. Anselmo Gomes de Oliveira
Projeto: Incorporação da doxorrubicina em microemulsões lipídicas e estudo da atividade antitumoral: tumor ascítico de Ehrlich

Parecer nº 33/2005 – Comitê de Ética em Pesquisa

O Comitê de Ética em Pesquisa desta Faculdade, considera o protocolo para uso de animais na pesquisa: "Incorporação da doxorrubicina em microemulsões lipídicas e estudo da atividade antitumoral: tumor ascítico de Ehrlich", estruturado dentro dos princípios éticos na experimentação animal do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal - COBEA e é de PARECER FAVORÁVEL à sua execução.

Araraquara, 3 de novembro de 2005.


Prof^ª. Dr^ª. MARIA VIRGINIA SCARPA GOMES DE OLIVEIRA
Coordenadora do CEP



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Câmpus de Araraquara



Protocolo CEP/FCF/CAr. nº 30/2005 – Animais em Pesquisa

Interessado: THALITA PEDRONI FORMARIZ

Orientador: Prof. Dr. Anselmo Gomes de Oliveira

Projeto: Incorporação da doxorrubicina em microemulsões lipídicas e estudo da atividade antitumoral: avaliação da toxicidade aguda

Parecer nº 32/2005 – Comitê de Ética em Pesquisa

O Comitê de Ética em Pesquisa desta Faculdade, considera o protocolo para uso de animais na pesquisa: "Incorporação da doxorrubicina em microemulsões lipídicas e estudo da atividade antitumoral: avaliação da toxicidade aguda", estruturado dentro dos princípios éticos na experimentação animal do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal - COBEA e é de PARECER FAVORÁVEL à sua execução.

Araraquara, 3 de novembro de 2005.



Prof^a. Dr^a. MARIA VIRGINIA SCARPA GOMES DE OLIVEIRA
Coordenadora do CEP