

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO NORTE
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E DA TERRA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA



Programa de Pós-Graduação
em Química



Obtenção de sistemas microemulsionados e estudo de simulação
por dinâmica molecular de sistemas micelares objetivando a
veiculação de produtos naturais bioativos

Fabiano do Espírito Santo Gomes

Tese de Doutorado
Natal/RN, março de 2010

Fabiano do Espírito Santo Gomes

**OBTENÇÃO DE SISTEMAS MICROEMULSIONADOS E ESTUDO DE
SIMULAÇÃO POR DINÂMICA MOLECULAR DE SISTEMAS MICELARES
OBJETIVANDO A VEICULAÇÃO DE PRODUTOS NATURAIS BIOATIVOS**

Defesa de Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal do Rio Grande do Norte como parte dos requisitos para a obtenção do título de doutor em química.

Orientadora: Dra. Tereza Neuma de Castro Dantas

Co-orientadora: Dra. Maria Aparecida Medeiros Maciel

NATAL, RN

2010

Divisão de Serviços Técnicos

Catálogo da Publicação na Fonte. UFRN / Biblioteca Setorial de Química

Gomes, Fabiano do Espírito Santo.

Obtenção de sistemas microemulsionados e estudo de simulação por dinâmica molecular de sistemas micelares objetivando a veiculação de produtos naturais bioativados. Natal, RN, 2010.

172 f.

Orientadora: Tereza Neuma de Castro Dantas.

Co-orientadora: Maria Aparecida Medeiros Maciel.

Tese (Doutorando em Química) - Universidade Federal do Rio Grande do Norte. Centro de Ciências Exatas e da Terra. Programa de Pós-Graduação em Química.

1. Emulsão – Tese. 2. Microemulsão – Tese. 3. Sistemas de liberação de fármacos – Tese. 4. *Trans*-desidrocrotonina – Tese. 5. Extratos vegetais – Tese. I. Dantas, Tereza Neuma de Castro. III. Maciel, Maria Aparecida Medeiros. III. Universidade Federal do Rio Grande do Norte. III. Título.

RN/UFRN/BSE- Química

CDU 615.451.2

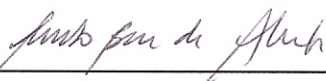
FABIANO DO ESPÍRITO SANTO GOMES

**OBTENÇÃO DE SISTEMAS MICROEMULSIONADOS E ESTUDO DE
SIMULAÇÃO POR DINÂMICA MOLECULAR DE SISTEMAS MICELARES
OBJETIVANDO A VEICULAÇÃO DE PRODUTOS NATURAIS BIOATIVOS**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Química da Universidade Federal do Rio Grande do Norte, em cumprimento às exigências para obtenção do título de Doutor em Química.

Aprovada em: 30 de março de 2010.

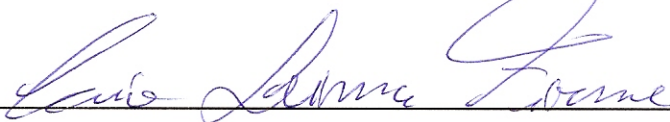
Comissão Examinadora:



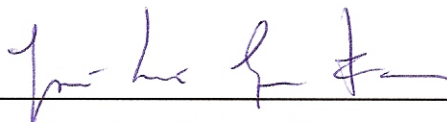
Dr. Ricardo Bicca de Alencastro – UFRJ



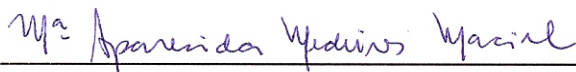
Dra. Aurea Echevarria – UFRJ



Dr. Caio Lima Firme – UFRN



Dr. José Luís Cardozo Fonseca – UFRN



Dra. Maria Aparecida Medeiros Maciel (co-orientadora) – UFRN



Dra. Tereza Neuma de Castro Dantas (orientadora) – UFRN

DEDICATÓRIA

Ao meu pai, José Almir Gomes (*in memoriam*).

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar a Deus, autor e fonte de toda vida.

À minha família, em especial à minha mãe e ao meu pai (*in memoriam*) por toda educação, instrução e suporte recebidos.

À minha amável esposa, Rosana, pelo carinho, amor, compreensão e apoio dispensados a mim durante todo o tempo do meu doutorado, em especial durante o tempo em que estive no Rio de Janeiro.

À minha orientadora e amiga Profa. Maria Aparecida Medeiros Maciel (Cida) pelas sugestões, conselhos, incentivos e broncas que me ajudaram a me tornar um pesquisador melhor. Obrigado por todos os ensinamentos, que não me fizeram crescer apenas na ciência, mas também como pessoa.

À Profa. Tereza Neuma de Castro Dantas pela orientação e suporte que permitiram a realização deste trabalho no Laboratório de Tecnologia de Tensoativos. Obrigado pelos momentos de aprendizado tanto no laboratório como nas viagens em congressos.

Ao Prof. Ricardo Bicca de Alencastro e todos os integrantes do LABMMOL/IQ-UFRJ (Profa. Magaly, Bruno, André, Tiago, Lucas, Ana Sodero, Felipe Fleming, Jocley, Estael, Monique) pelo acolhimento, suporte e orientação dispensados a mim durante minha estadia no Rio de Janeiro para a realização de estudos computacionais.

Aos professores do IQ-UFRJ Rosane San Gil, Carlos Kaiser e Angelo da Cunha Pinto pelo suporte dados a mim durante a minha estadia na UFRJ.

À Profa. Nereide Magalhães e todos os seus alunos do LIKA (UFPE-PE), em especial Waldenice e Marcília, pela colaboração em outros trabalhos científicos.

À Profa. Áurea Echevarria, da UFRRJ, juntamente com suas alunas Kenia e Amanda, pela realização dos testes antioxidantes e colaboração em trabalhos científicos.

À colega Maria Beatriz (Bia), juntamente com seus orientadores Prof. Djalma Ribeiro e Profa. Sílvia Regina, pela realização dos ensaios bacteriostáticos.

Aos professores Caio Firme e José Luiz, que estiveram sempre disponíveis para discussões. Obrigado pelas sugestões e críticas que ajudaram a elevar a qualidade deste trabalho.

Aos meus amigos e colegas de laboratório (LTT): Gineide, Ellen, Cássia, Gil, Ciro, Breno, Cátia, Keila, Alyne, Janaína, Alcides, Kaline, Cláudia, Verônica, Samanta, Izabelly, e todos os outros. Obrigado pelo companheirismo e amizade de todos vocês.

Ao CNPq pelo suporte financeiro concedido.

RESUMO

Dos novos fármacos lançados no mercado a partir de 1980, cerca de 30% apresentam origem natural ou semissintética. Entre 40 e 70% destes novos protótipos de fármacos (naturais ou sintéticos) apresentam baixa solubilidade aquosa, o que pode inviabilizar a sua utilização comercial. Uma das alternativas encontrada pela indústria farmacêutica foi a veiculação dessas substâncias a partir de veículos ou sistemas de liberação de fármacos, tais como: micelas, microemulsões, lipossomos, nanopartículas e ciclodextrinas. Neste trabalho, sistemas microemulsionados biologicamente compatíveis foram obtidos utilizando a mistura Tween 80 e Span 20, na proporção 3:1, como tensoativo, miristato de isopropila ou ácido oléico como fase oleosa, água bidestilada, e em alguns sistemas, etanol como cotensoativo. Também foram obtidos sistemas auto-microemulsificantes (SMEDDS) utilizando propilenoglicol ou sorbitol como cotensoativo. As microemulsões obtidas foram caracterizadas quanto ao comportamento reológico, tamanho das gotículas e condutividade elétrica. O produto natural bioativo *trans*-desidrocrotonina (DCTN), bem como extratos e frações das espécies vegetais *Croton cajucara* Benth (Euphorbiaceae), *Anacardium occidentale* L. (Anacardiaceae) e *Phyllanthus amarus* Schum. & Thonn. (Euphorbiaceae), foram solubilizados satisfatoriamente nos sistemas microemulsionados obtidos, enquanto que outros produtos também isolados da espécie *Croton cajucara*, *trans*-crotonina e ácido acetilaleurítico, não apresentaram resultados satisfatórios em termos de solubilidade. A avaliação da propriedade antioxidante, pelo método do DPPH, dos extratos vegetais incorporados nos sistemas microemulsionados obtidos evidenciou a capacidade antioxidante dos extratos de *Phyllanthus amarus* e *Anacardium occidentale*, bem como a atuação dos sistemas microemulsionados, que para o caso do extrato etanólico de *Phyllanthus amarus* dobrou a sua atividade antioxidante quando solubilizado em microemulsões. O extrato hidroalcoólico de *Croton cajucara* incorporado em um sistema auto-microemulsificante mostrou atividade bacteriostática frente a colônias de bactérias *Bacillus cereus* e *Escherichia coli*. Adicionalmente, foi realizado um estudo de simulação computacional por Dinâmica Molecular de sistemas micelares para uso farmacológico contendo tensoativos derivados de açúcares, *N*-dodecilamino-1-deoxilactitol e *N*-dodecil-D-lactosilamina, que indicou que o processo de micelização do primeiro sistema é mais favorável que o segundo.

Palavras-chave: Microemulsão. Sistemas de liberação de fármacos. *Trans*-desidrocrotonina. Extratos vegetais. Atividade antioxidante. Dinâmica Molecular.

ABSTRACT

Among the new drugs launched into the market since 1980, up to 30% of them belong to the class of natural products or they have semisynthetic origin. Between 40-70% of the new chemical entities (or lead compounds) possess poor water solubility, which may impair their commercial use. An alternative for administration of poorly water-soluble drugs is their vehiculation into drug delivery systems like micelles, microemulsions, nanoparticles, liposomes, and cyclodextrin systems. In this work, microemulsion-based drug delivery systems were obtained using pharmaceutically acceptable components: a mixture Tween 80 and Span 20 in ratio 3:1 as surfactant, isopropyl mirystate or oleic acid as oil, bidistilled water, and ethanol, in some formulations, as cosurfactants. Self-Microemulsifying Drug Delivery Systems (SMEDDS) were also obtained using propylene glycol or sorbitol as cosurfactant. All formulations were characterized for rheological behavior, droplet size and electrical conductivity. The bioactive natural product *trans*-dehydrocrotonin, as well some extracts and fractions from *Croton cajucara* Benth (Euphorbiaceae), *Anacardium occidentale* L. (Anacardiaceae) e *Phyllanthus amarus* Schum. & Thonn. (Euphorbiaceae) specimens, were satisfactorily solubilized into microemulsions formulations. Meanwhile, two other natural products from *Croton cajucara*, *trans*-crotonin and acetyl aleuritolic acid, showed poor solubility in these formulations. The evaluation of the antioxidant capacity, by DPPH method, of plant extracts loaded into microemulsions evidenced the antioxidant activity of *Phyllanthus amarus* and *Anacardium occidentale* extracts. For *Phyllanthus amarus* extract, the use of microemulsions duplicated its antioxidant efficiency. A hydroalcoholic extract from *Croton cajucara* incorporated into a SMEDDS formulation showed bacteriostatic activity against colonies of *Bacillus cereus* and *Escherichia coli* bacteria. Additionally, Molecular Dynamics simulations were performed using micellar systems, for drug delivery systems, containing sugar-based surfactants, *N*-dodecylamino-1-deoxylactitol and *N*-dodecyl-D-lactosylamine. The computational simulations indicated that micellization process for *N*-dodecylamino-1-deoxylactitol is more favorable than *N*-dodecyl-D-lactosylamine system.

Keywords: Microemulsions. Drug delivery systems. *Trans*-dehydrocrotonin. Plant extracts. antioxidant capacity. Molecular Dynamics.

LISTA DE FIGURAS

Figura 2.1 – Representação esquemática de uma molécula anfifílica.....	22
Figura 2.2 – Exemplos de tensoativos iônico, não-iônico e zwitteriônico	23
Figura 2.3 – Representação esquemática da classificação estrutural de tensoativos.....	25
Figura 2.4 – Atuação de moléculas anfifílicas na superfície água-ar e no interior de uma solução aquosa.....	26
Figura 2.5 – Representação esquemática de agregados formados por tensoativos em solução aquosa.....	27
Figura 2.6 – Representação gráfica para a determinação da CMC a partir de diferentes parâmetros físico-químicos	28
Figura 2.7 – Representação esquemática dos agregados em função do parâmetro de empacotamento.....	32
Figura 2.8 – Representação esquemática das três microestruturas mais comumente encontradas em sistemas microemulsionados: (a) microemulsão água em óleo; (b) microemulsão óleo em água; (c) microemulsão bicontínua	34
Figura 2.9 – (a) Representação esquemática de um diagrama de fases pseudo-ternário. (b) Diagrama de fases pseudo-ternário hipotético onde estão representadas as regiões de microemulsão (1ϕ), de emulsão ou duas fases (2ϕ) e cristais líquidos (CL)	36
Figura 2.10 – Estrutura química da DCTN, CTN e AAA	50
Figura 2.11 – Exemplo de uma caixa MD, a sua transição e condições de fronteira a duas dimensões	57
Figura 3.1 – Estrutura das moléculas de tensoativo (a) <i>N</i> -dodecilamino-1-deoxilactitol ($C_{12}N$ -lactitol) e (b) <i>N</i> -dodecil-D-lactosilamina ($C_{12}N$ -lactosil).....	76
Figura 5.1 – Capacidade máxima de formação de misturas isotrópicas em função quantidade de água, variando-se a proporção entre os tensoativos Tween e Span 20.....	88
Figura 5.2 – Diagramas de fases de misturas contendo Tween:Span 20 (3:1), IPM e água. (a) Tween 80; (b) Tween 40; (c) Tween 20	89
Figura 5.3 – Diagramas de fases de misturas contendo Tween 80:Span 20 (3:1) e etanol nas razões (a) C/T igual a 0,5 e (b) C/T igual a 1,0	91

Figura 5.4 – Diagramas de fases de misturas contendo (a) IPM, (b) Miglyol e (c) ácido oléico como fase oleosa.....	93
Figura 5.5 – Diagramas de fases a partir dos quais foram obtidos os sistemas auto-microemulsificantes (a) ME-G e (b) ME-H. A região entre as duas linhas pontilhadas indica a região propícia para formulação de sistemas auto-microemulsificantes.	96
Figura 5.6 – Perfil de viscosidade dos sistemas auto-microemulsificantes no decorrer de uma diluição com água.....	109
Figura 5.7 – Gráficos de condutividade elétrica em função da composição de água nos sistemas auto-microemulsificantes ME-G (a) e ME-H (b).	113
Figura 5.8 – Gráfico da primeira derivada $dk/d\Phi_w$ em função da composição de água.....	113
Figura 5.9 – Percentual de sobrevivência de colônias da (a) bactéria gram-positiva <i>B. cereus</i> e (b) bactéria gram-negativa <i>E. coli</i> em meio de cultura LB contendo diferentes concentrações do extrato CC-EHA após 24 h de incubação. Cont+ = controle positivo (ampicilina : cloranfenicol, 4:1). Cont- = controle negativo	119
Figura 5.10 – Representação esquemática dos monômeros (a) $C_{12}N$ -lactosil e (b) $C_{12}N$ -lactitol. São mostrados os átomos de oxigênio (vermelho), carbono (ciano), nitrogênio (azul) e hidrogênio (branco) das moléculas de tensoativo.....	122
Figura 5.11 – Snapshots dos agregados micelares (a) $C_{12}N$ -lactitol e (b) $C_{12}N$ -lactosil no decorrer de 10 ns de simulação MD. São mostrados os átomos de oxigênio (vermelho), carbono (ciano), nitrogênio (azul) e hidrogênio (branco) das moléculas de tensoativo, enquanto que as moléculas de água foram omitidas por motivos de clareza.....	124
Figura 5.12 – Raio de giro, R_g , de micelas formadas por $C_{12}N$ -lactitol (preto) e $C_{12}N$ -lactosil (cinza) no decorrer de 9,5 ns de simulação MD	125
Figura 5.13 – Área Superficial Acessível ao Solvente (SASA) de micelas contendo moléculas de $C_{12}N$ -lactitol (negrito) e $C_{12}N$ -lactosil no decorrer de 9,5 ns de simulação MD. São mostradas as áreas superficiais expostas das cadeias alquílicas (inferior), e dos grupos glucosil/glucitol (meio) e galactosil (superior)	126
Figura 5.14 – Snapshot da simulação MD evidenciando uma das interações intramoleculares mais frequentes observadas no sistema micelar $C_{12}N$ -lactitol. O número médio das ligações de hidrogênio intra-molecular O3(glc)–	

H...O4(glc) and O3(glc)-H...O5(gal) é 0,14 e 0,12, respectivamente. Esta
conformação adotada pelas moléculas de C₁₂N-lactitol previne o átomo
O3(glc) do contato com a água. 131

LISTA DE TABELAS

Tabela 2.1 – Estrutura química de alguns dos principais tensoativos farmacologicamente aceitáveis	42
Tabela 2.2 – Estrutura química de alguns dos principais óleos farmacologicamente aceitáveis	46
Tabela 3.1 – Fármacos microemulsionados para administração oral	64
Tabela 3.2 – Fármacos microemulsionados para administração parenteral	66
Tabela 3.3 – Fármacos microemulsionados para administração transdérmica	68
Tabela 3.4 – Fármacos microemulsionados para outras vias de administração	71
Tabela 4.1 – Produtos utilizados na formulação das microemulsões	78
Tabela 5.1 – Composição das Microemulsões (ME) (% em massa)	94
Tabela 5.2 – Solubilidade da DCTN nos diversos veículos testados	98
Tabela 5.3 – Dados de solubilidade da DCTN no sistema ME-G após sucessivas diluições em água	101
Tabela 5.4 – Solubilidade da CTN nos diversos veículos testados	102
Tabela 5.5 – Solubilidade dos extratos vegetais nos sistemas microemulsionados testados ..	103
Tabela 5.6 – Dados de viscosidade e índice de refração dos sistemas microemulsionados...	106
Tabela 5.7 – Dados de viscosidade e índice de refração dos sistemas auto-microemulsificantes	108
Tabela 5.8 – Dados de diâmetro das gotículas e índice de polidispersão dos sistemas microemulsionados.....	110
Tabela 5.9 – Dados de diâmetro das gotículas e índice de polidispersão dos sistemas auto-microemulsificantes	112
Tabela 5.10 – Valores de CE ₅₀ obtidos para os extratos CC-EH, CC-EC e CC-EM solubilizados em sistemas microemulsionados	116
Tabela 5.11 – Valores de CE ₅₀ obtidos para os extratos e frações de <i>Anacardium occidentale</i>	118
Tabela 5.12 – Valores de CE ₅₀ obtidos para o extrato metanólico de <i>Phyllanthus amarus</i> ...	118
Tabela 5.13 – Cargas parciais atômicas das moléculas de C ₁₂ N-lactitol e C ₁₂ N-lactosil usadas nas simulações MD.....	123
Tabela 5.14 – Número médio de ligações de hidrogênio inter-monômero e monômero-solvente no decorrer dos últimos 5 ns de simulação MD.....	128

Tabela 5.15 – Número médio de ligações de hidrogênio das principais interações intramônômeros por moléculas no decorrer dos últimos 5 ns de simulação^a 130

LISTA DE SÍMBOLOS

- CMC – Concentração micelar crítica
- ΔG – Variação da energia livre de Gibbs
- ΔH – Variação de entalpia
- T – Temperatura
- ΔS – Variação de entropia
- P – Parâmetro e empacotamento
- V – Volume da cadeia hidrocarbônica
- Q_{rev} – Calor reversível
- a_0 – Área ocupada pela cabeça polar na interface polar-apolar
- l – Comprimento crítico da cadeia apolar
- a_{hc} – Área da seção transversal da parte hidrocarbônica
- A/O – Microemulsão do tipo água em óleo
- O/A – Microemulsão do tipo óleo em água
- ΔG_f – Energia livre de micelização
- γ – Tensão superficial
- ΔA – Variação da área interfacial
- CL – Cristais líquidos
- BHL – Balanço hidrófilo-lipófilo
- IPM – Miristato de isopropila
- IPP – Palmitato de isopropila
- DLS – Espalhamento de luz dinâmico
- SANS – Espalhamento de nêutrons a baixo ângulo
- SAXS – Espalhamento de raios-X a baixo ângulo
- TEM – Microscopia eletrônica de transmissão
- UV-Vis – Ultravioleta-visível
- CLAE – Cromatografia líquida de alta eficiência
- DCTN – *trans*-desidrocrotonina
- CTN – *trans*-crotonina
- AAA – Ácido acetil aleuritólico
- MD – Simulação por dinâmica molecular
- MC – Simulação por Monte Carlo

k_b – Constante de Boltzmann
 E – Energia potencial
 NpT – Ensemble com pressão, temperatura e número de partículas constantes
 NVT – Ensemble com volume, temperatura e número de partículas constantes
 NVE – Ensemble microcanônico (energia, volume e número de partículas constantes)
SMEDDS – Sistemas auto-microemulsificantes
CC-EH – Extrato hexânico de *Croton cajucara*
CC-EC – Extrato clorofórmico de *Croton cajucara*
CC-EM – Extrato metanólico de *Croton cajucara*
TLC – Cromatografia em camada delgada
AO-EM – Extrato metanólico de *Anacardium occidentale*
AO-FO – Fração rica em óleo fixo de *Anacardium occidentale*
AO-FT – Fração rica em taninos de *Anacardium occidentale*
PA-EE – Extrato etanólico de *Phyllanthus amarus*
 k – condutividade elétrica
DPPH – 2,2-difenil-picril-hidrazila
 CE_{50} – concentração efetiva na captura de 50% do radical livre DPPH
%AA – Percentual da atividade antioxidante
LB – Meio de cultura Luria Broth
PME – *Particle Mesh Ewald*
SASA – Área superficial acessível ao solvente
T80 – Tween 80
T40 – Tween 40
T20 – Tween 20
S20 – Span 20
C/T – Razão cotensoativo/Tensoativos
EtOH – Etanol
AO – Ácido oléico
ME – Microemulsão
PG – Propilenoglicol
RMN – Ressonância magnética nuclear
CC-FA – Fração rica em alcalóides de *Croton cajucara*
CC-EHA – Extrato hidro-alcoólico de *Croton cajucara*
 Φ_w – Composição da fase aquosa

Φ_p – limiar de percolação

C₁₂N-lactitol – *N*-dodecilamino-1-deoxilactitol

C₁₂N-lactosil – *N*-dodecil-*D*-lactosilamina

R_g – Raio de giro

Glc – Grupo glucitol/glicosil

Gal – Grupo galactosil

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	19
2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	22
2.1 TENSOATIVOS.....	22
2.1.1 Classificação quanto à natureza da cabeça polar	23
2.1.2 Classificação quanto à estrutura química	24
2.1.3 Atividade dos tensoativos em solução	25
2.3.1.1 Termodinâmica de micelização em solução aquosa.....	29
2.2 MICROEMULSÕES	33
2.2.1 Formação de microemulsões	34
2.2.2 Diagramas de fases	36
2.2.3 Aplicação das microemulsões	38
2.2.4 Microemulsões como sistemas de liberação de fármacos	38
2.2.4.1 Componentes de microemulsões	40
2.2.4.1.1 Tensoativos em microemulsões biológicas	41
2.2.4.1.2 Cotensoativos em microemulsões biológicas	43
2.2.4.1.3 Fase oleosa em microemulsões biológicas	45
2.2.4.1.4 Fase aquosa em microemulsões biológicas	46
2.2.3 Caracterização físico-química	47
2.3 PRODUTOS NATURAIS E PROPRIEDADES FARMACOLÓGICAS	48
2.3.1 <i>Croton cajucara</i> Benth	48
2.3.1.1 <i>trans</i> -Desidrocrotonina.....	49
2.3.1.2 Extratos da sacaca.....	50
2.3.2 <i>Phyllanthus amarus</i> Schum. & Thonn	51
2.3.3 <i>Anacardium occidentale</i> L.	51
2.4 SIMULAÇÕES POR DINÂMICA MOLECULAR	52
2.4.1 Interações moleculares	54
2.4.2 Campos de força e parametrização	55
2.4.3 Etapas da simulação MD	56
2.4.3.1 Ensembles.....	58
3 ESTADO DA ARTE	61
3.1 MICROEMULSÕES COMO VEÍCULOS DE FÁRMACOS.....	61

3.1.1 Administração oral de microemulsões	62
3.1.2 Administração parenteral de microemulsões	65
3.1.3 Administração transdérmica de microemulsões	67
3.1.4 Administração ocular de microemulsões	70
3.2 PRODUTOS NATURAIS COMO FONTE DE FÁRMACOS	72
3.2.1 Sistemas de liberação de fármacos e os produtos naturais	73
3.3 MICELAS FORMADAS POR ALQUIL-GLICOSÍDEOS E SIMULAÇÃO POR DINÂMICA MOLECULAR	75
4 METODOLOGIA EXPERIMENTAL	78
4.1 ESCOLHA DOS COMPONENTES DA MICROEMULSÃO	78
4.2 PRODUTOS NATURAIS MICROEMULSIONADOS	79
4.2.1 Extratos vegetais	79
4.3 OBTENÇÃO DOS DIAGRAMAS DE FASES	80
4.4 TESTES DE SOLUBILIDADE	80
4.5 CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DAS MICROEMULSÕES	81
4.5.1 Índice de refração	81
4.5.2 Reologia	82
4.5.3 Distribuição de tamanho das gotículas	82
4.5.4 Condutividade elétrica	82
4.6 ESTUDO DAS PROPRIEDADES ANTIOXIDANTE E BACTERIOSTÁTICA	83
4.6.1 Propriedade antioxidante	83
4.6.2 Atividade bacteriostática	84
4.7 SIMULAÇÃO POR DINÂMICA MOLECULAR DE MICELAS	84
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	87
5.1 ESCOLHA DOS COMPONENTES DA MICROEMULSÃO	87
5.1.1 Escolha do tensoativo	87
5.1.2 Escolha do cotensoativo	90
5.1.3 Escolha da fase oleosa	92
5.2 OBTENÇÃO DOS SISTEMAS MICROEMULSIONADOS	94
5.2.1 Obtenção dos sistemas auto-microemulsificantes	95
5.3 TESTES DE SOLUBILIDADE	97
5.3.1 Solubilização da <i>trans</i>-desidrocrotonina	97
5.3.1.1 Solubilização nos sistemas auto-microemulsificantes	100
5.3.2 Solubilização de outros produtos bioativos de <i>Croton cajucara</i>	102

5.3.3 Solubilização de extratos vegetais	103
5.3.4 Considerações gerais sobre os testes de solubilidade	104
5.4 CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA	105
5.4.1 Reologia	105
5.4.1.1 Reologia dos sistemas auto-microemulsificantes	107
5.4.2 Distribuição de tamanho das gotículas	110
5.4.3 Condutividade elétrica	112
5.4.4 Considerações gerais sobre a caracterização físico-química	114
5.5 AVALIAÇÃO DAS PROPRIEDADES ANTIOXIDANTE E BACTERIOSTÁTICA ..	115
5.5.1 Propriedade antioxidante	115
5.5.1.1 Extratos de <i>Croton cajucara</i> solubilizados em microemulsões	116
5.5.1.2 Extratos de <i>Anacardium occidentale</i> solubilizados em microemulsões.....	117
5.5.1.3 Extratos de <i>Phyllanthus amarus</i> solubilizados em microemulsões.....	118
5.5.2 Atividade bacteriostática	119
5.5.3 Considerações gerais sobre os ensaios antioxidantes e bacteriostáticos	120
5.6 SIMULAÇÃO MD DE MICELAS DE C₁₂N-LACTITOL E C₁₂N-LACTOSIL	121
5.6.1 Estabilidade e tamanho dos sistemas micelares	124
5.6.2 Área Superficial Acessível ao Solvente (SASA)	125
5.6.3 Interações inter-monômeros	127
5.6.4 Interações intra-monômeros	129
5.6.5 Perfil de hidratação	130
5.6.6 Considerações gerais sobre as simulações MD	132
6 CONCLUSÕES GERAIS	134
REFERÊNCIAS	137
ANEXO A – Curva de Calibração da DCTN para testes de solubilidade por espectroscopia no UV-Vísível	161
ANEXO B – Gráficos de comportamento reológico tensão (τ) x taxa de cisalhamento ($\dot{\gamma}$)	162

Introdução

1 INTRODUÇÃO

Anualmente, milhares de novos protótipos de fármacos (*lead compounds*) ou novas substâncias bioativas, isto é, moléculas que apresentam potencial biológico ou que são candidatos a fármacos, são descobertas através de técnicas de química combinatória e *High Throughput Screening* (HTS) (LIPINSKI *et al.*, 1997; KOEHN e CARTER, 2005). No entanto, 40 a 70% desses novos protótipos de fármacos apresentam baixa solubilidade aquosa, inviabilizando, em alguns casos, o avanço nos estudos científicos que poderiam resultar na comercialização do fármaco (GODDEERIS *et al.*, 2006; KOGAN e GARTI, 2006).

A grande variedade de plantas e de substâncias presentes em cada espécie vegetal faz com que o reino vegetal seja uma das principais fontes de novos protótipos de fármacos, em especial antibióticos e agentes antitumorais. De fato, quase 30% dos novos fármacos lançados no mercado a partir da década de 1980 até os dias de hoje são classificados como produtos naturais ou semissintéticos (NEWMAN e CRAGG, 2007). Este percentual poderia ser ainda maior se não fosse a baixa solubilidade aquosa comum nos compostos de origem natural.

Uma das espécies que detém destaque progressivo por suas propriedades biológicas é o *Croton cajucara* Benth. (Euphorbiaceae), vulgarmente conhecido como “sacaca”, uma espécie nativa da região amazônica do Brasil. Deste *Croton* pode ser isolado o diterpeno bioativo *trans*-desidrocrotonina, que está correlacionado com as principais propriedades farmacológicas desta planta (MACIEL *et al.*, 2000). No entanto, têm sido reportados casos de hepatotoxicidade após o uso crônico e indevido do chá das folhas da sacaca (MACIEL *et al.*, 2002).

A fim de superar a limitação da baixa solubilidade, bem como outras limitações comuns aos protótipos de fármacos, foi desenvolvida uma série de sistemas de liberação de fármacos, tais como nanopartículas, lipossomos, emulsões, microemulsões, soluções micelares, dendrímeros e complexos de ciclodextrina. Dentre os muitos benefícios do uso destes veículos, destacam-se: o aumento da eficácia terapêutica de um fármaco através do aumento da sua solubilidade aquosa, proteção contra degradação enzimática, aumento do intervalo entre as doses, e/ou diminuição de efeitos adversos pela administração de menor dose ou pela liberação do fármaco em sítio específico. Dentre estes sistemas, as micelas e as microemulsões têm se destacado pelo baixo custo e pela facilidade na preparação das formulações, bem como pela estabilidade das formulações.

A utilização de microemulsões como sistemas de liberação de fármacos requer um cuidado especial na escolha de componentes que devem ser farmacologicamente aceitáveis. Tensoativos não-iônicos e zwitteriônicos são preferidos, enquanto que o uso de cotensoativos deve ser evitado ou minimizado por razões toxicológicas. A caracterização físico-química dos sistemas de liberação de fármacos é de fundamental importância para orientar o seu uso nas diversas vias de administração (injetável, oral, transdérmica, etc.). Em geral, experimentos de reologia, tamanho de partículas, condutividade elétrica e de solubilidade são frequentemente utilizados para a caracterização de sistemas microemulsionados.

Os métodos computacionais modernos também têm sido um importante instrumento utilizado tanto para o descobrimento de novos fármacos quanto para a otimização da formulação ou do fármaco. Sistemas micelares podem ser caracterizados por métodos de simulação por Dinâmica Molecular, cujos resultados geralmente apresentam consonância com dados obtidos experimentalmente.

O presente trabalho teve como objetivo a obtenção e a caracterização de sistemas microemulsionados aplicados à solubilização de produtos naturais bioativos isolados de *Croton cajucara*, bem como de extratos obtidos das espécies vegetais *Croton cajucara* Benth. (Euphorbiaceae), *Anacardium occidentale* L. (Anacardiaceae) e *Phyllanthus amarus* Schum. & Thonn. (Euphorbiaceae). Adicionalmente, objetivou-se o estudo computacional de simulação por Dinâmica Molecular de sistemas micelares formados por tensoativos à base de açúcares, objetivando a ampliação do trabalho realizado na dissertação de mestrado deste autor (GOMES, 2004), bem como a disponibilização de novos veículos de fármacos.

Fundamentação Teórica

2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

Este capítulo está subdividido em quatro partes, em que são discutidos: aspectos teóricos referentes aos tensoativos, às microemulsões, às propriedades farmacológicas das espécies vegetais utilizadas neste trabalho, e à técnica de simulação por Dinâmica Molecular.

2.1 TENSOATIVOS

Tensoativos ou surfactantes são compostos que apresentam a propriedade de se adsorver na superfície ou interfaces de um sistema, alterando de maneira significativa a energia livre superficial ou interfacial. São moléculas anfífilicas constituídas de duas regiões bem características: uma polar ou hidrofílica, formada por grupos eletricamente carregados ou cadeias polioxietilênicas, e outra região apolar ou hidrofóbica, que é constituída geralmente de cadeias hidrocarbônicas. A presença, na mesma molécula, de duas partes com polaridades distintas caracteriza o termo anfílico. Uma representação esquemática de um tensoativo pode ser vista na Figura 2.1, em que comumente a região hidrofóbica é representada por uma cauda apolar, e a região hidrofílica por uma cabeça polar (ROSSI *et al.*, 2006).

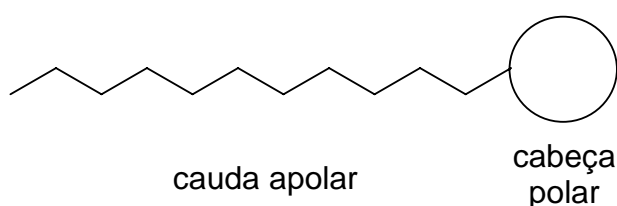


Figura 2.1 – Representação esquemática de uma molécula anfífilica

2.1.1 Classificação quanto à natureza da cabeça polar

Quanto à natureza do grupo hidrofílico, os tensoativos podem ser classificados em iônicos (catiônicos ou aniônicos), não-iônicos ou anfóteros (zwitteriônicos) (ROSSI *et al.*, 2006) (Figura 2.2).

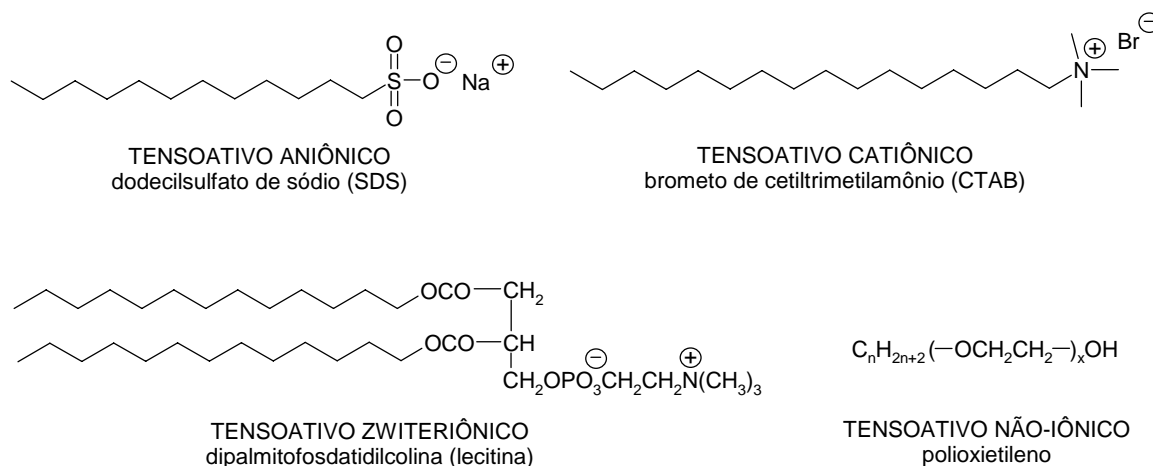


Figura 2.2 – Exemplos de tensoativos iônico, não-iônico e zwitteriônico

Especificamente, os tensoativos catiônicos produzem, em solução aquosa, íons carregados positivamente em sua superfície ativa. São representados pela forma geral $\text{R}_n\text{X}^+\text{Y}^-$, em que R representa uma ou mais cadeias hidrofóbicas, X pode ser átomos de N, P, S, As, Te, Sb, Bi ou os halogênios, e Y um contra-íon. Apresentam grande poder de adsorção nas mais variadas superfícies, porém sua toxicidade é geralmente mais elevada em comparação com as demais classes. São utilizados comumente no tratamento de têxteis e em condicionadores para cabelo. Os sais de amônio quaternário, como o brometo de cetiltrimetilamônio (CTAB), estão entre os principais compostos desta classe de tensoativos.

Os tensoativos aniônicos contêm, na sua maioria, um grupo polar do tipo sulfato, sulfonato, carboxilato ou fosfato, combinado com uma cadeia hidrofóbica, que, em solução aquosa, se ionizam e se tornam negativamente carregados. Esta classe constitui no principal tipo de tensoativo, correspondendo a cerca de 60% da produção mundial de surfactantes (HOLMBERG *et al.*, 2003). São largamente utilizados na indústria de limpeza, como detergentes e sabões. Os sabões possuem na sua parte hidrofílica um sal de sódio ou de potássio de ácido carboxílico, enquanto os detergentes têm como matéria-prima compostos sulfonados derivados do petróleo, como o dodecil-sulfato de sódio (SDS). Tensoativos

aniônicos são geralmente incompatíveis com os catiônicos, e sensíveis à “água dura” (solução aquosa contendo certos cátions divalentes, como Ca^{2+} e Mg^{2+}).

Os tensoativos que apresentam em sua estrutura molecular dois grupos polares que, em meio aquoso, tendem a produzir íons de cargas opostas são chamados de tensoativos anfóteros ou zwitteriônicos. São extremamente dependentes do pH da solução em que se encontram, podendo se comportar tanto como um tensoativo catiônico quanto aniônico, ou ainda, como um não-iônico. São compatíveis com todas as outras classes e geralmente apresentam propriedades biológicas (HOLMBERG *et al.*, 2003), sendo, portanto, biocompatíveis.

Os tensoativos não-iônicos são substâncias cujas moléculas não formam íons em solução aquosa, ou seja, são incapazes de se ionizarem. Sua natureza hidrofílica é justificada pela presença de grupos oxietilênicos situados ao longo de uma cadeia hidrofóbica. Dessa forma, a hidrofília (polaridade) destes compostos é determinada pelo número de átomos de carbono na cadeia lipofílica (quanto menor esse número maior a hidrofobicidade), bem como pela quantidade de subunidades polares presentes em sua estrutura (quanto maior a quantidade maior a hidrofobicidade). Apresentam a vantagem de serem pouco suscetíveis ao pH e à presença de íons na solução em que se encontram, e são normalmente compatíveis com todos os outros tipos de tensoativos, sendo a segunda classe de tensoativo mais utilizada no mundo (HOLMBERG *et al.*, 2003).

2.1.2 Classificação quanto à estrutura química

Com relação à sua estrutura química, os tensoativos podem ser classificados em monocatenários (apresentam uma única cadeia hidrocarbônica), bicatenários (duas caudas apolares) e tricatenários (com três cadeias alquílicas) (Figura 2.3).

Existem ainda os tensoativos geminados (diméricos) (MENGER e LITTAU, 1991), que apresentam sequencialmente: uma cadeia hidrocarbônica longa, um grupo iônico, uma cadeia espaçadora, um segundo grupo iônico, e outra cadeia hidrocarbônica (Figura 2.3). Quando um tensoativo geminado apresenta os seus dois grupos iônicos diferentes entre si, ele é chamado de heterogeminado (ALAMI e HOLMBERG, 2003). Em função da forte distorção da estrutura no meio aquoso, causada pela presença de duas cadeias laterais na molécula, os tensoativos geminados e os heterogeminados são agentes mais eficazes na redução da tensão interfacial. Adicionalmente, este tipo de tensoativo forma agregados em concentrações mais baixas que os seus correspondentes monopolares.

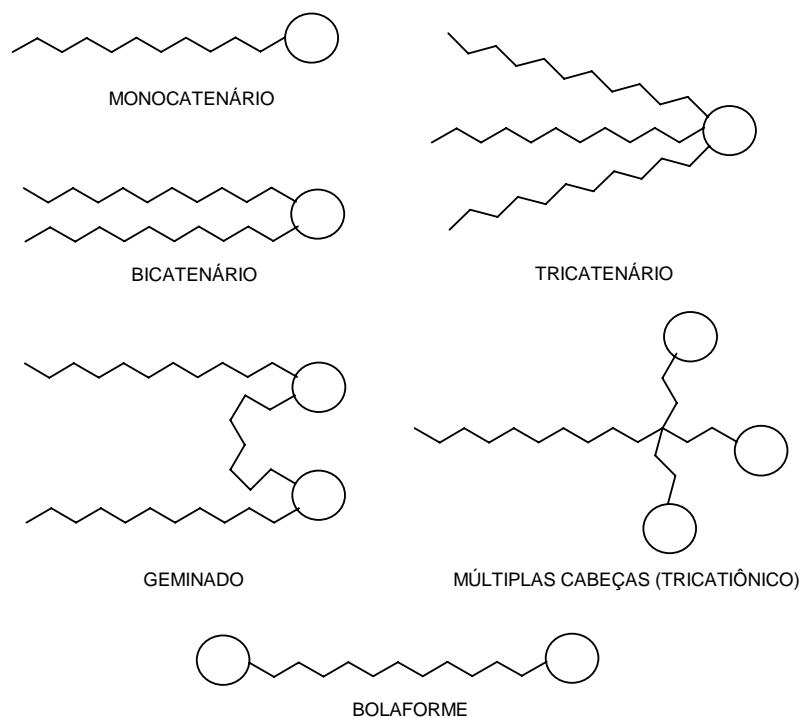


Figura 2.3 – Representação esquemática da classificação estrutural de tensoativos

Outro tipo de classificação é dado aos tensoativos cujas moléculas apresentam dois sítios positivos ou negativos separados por uma distância relativamente grande, tendo sido denominados tensoativos ou eletrólitos bolaformes (BRODY e FUOSS, 1956). Existem ainda tensoativos com múltiplas cabeças (mono, di ou tricatiônicos) cujos agregados formados em meio aquoso, diminuem progressivamente de tamanho à medida que aumenta a quantidade de grupos polares (BHATTACHARYA e HALDAR, 2002).

2.1.3 Atividade dos tensoativos em solução

O comportamento dos tensoativos em soluções deriva diretamente de sua estrutura molecular (regiões com solubilidade distinta em água). A parte hidrofílica (ou solvofílica) consiste geralmente em um grupo polar pequeno, que pode ser iônico ou sem carga. A parte hidrofóbica ou apolar é constituída de uma cadeia longa, geralmente de natureza hidrocarbônica, podendo apresentar em alguns casos composição fluoralquil ou aromática.

Um surfactante (que literalmente significa agente ativante em uma superfície) é caracterizado pela tendência de se adsorver em superfícies e interfaces. O termo interface denota a fronteira entre duas fases imiscíveis, enquanto o termo superfície é geralmente aplicado quando uma dessas fases é um gás ou vapor. Existem basicamente cinco tipos diferentes de interfaces nas quais moléculas de tensoativos podem ser adsorvidas: sólido-vapor (superfície), sólido-líquido (interface), sólido-sólido (interface), líquido-vapor (superfície) e líquido-líquido (interface). Esta propriedade de adsorção em interfaces está relacionada com a redução da energia livre na interface. A energia livre interfacial por unidade de área representa a quantidade de trabalho necessária para a expansão da interface e é frequentemente denominada de tensão interfacial (HOLMBERG *et al.*, 2003).

A adição de tensoativos a uma solução aquosa faz com que as moléculas anfifílicas se adsorvam na superfície água-ar, de modo que a parte hidrofílica do tensoativo esteja voltada para a água, enquanto a parte hidrofóbica se encontra direcionada para o ar (Figura 2.4). Deste modo, a superfície água-ar é coberta por moléculas anfifílicas e a tensão interfacial da solução é reduzida. Quando esta superfície se encontra saturada com moléculas anfifílicas, a adição de mais tensoativo provoca a migração destas novas moléculas introduzidas (monômeros) para o interior da solução. A parte polar de cada monômero é hidratada ao contato com a fase aquosa, e a parte hidrofóbica se auto-associa formando agregados micelares de modo a minimizar o seu contato com a água (Figura 2.5). A estrutura dos agregados formados por um tensoativo em solução aquosa depende de vários parâmetros, tais como: estrutura molecular dos compostos anfifílicos, hidratação dos grupos polares, interações intermoleculares, temperatura e concentração micelar (ISRAELACHVILI, 1976).

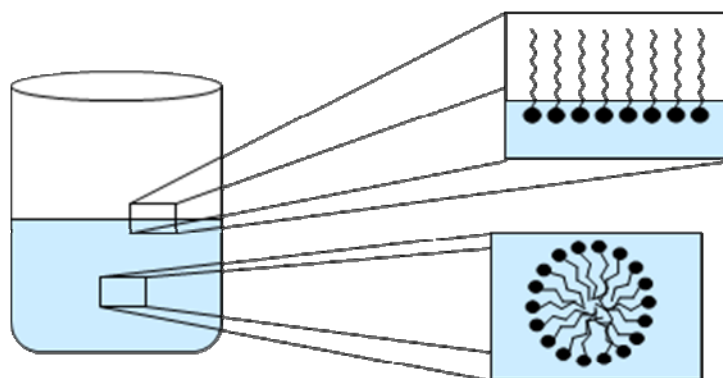


Figura 2.4 – Atuação de moléculas anfifílicas na superfície água-ar e no interior de uma solução aquosa

Em geral, podem ser encontradas micelas em soluções com baixa concentração de tensoativo. A concentração em que agregados micelares começam a se formar é denominada

de concentração micelar crítica (CMC), e representa uma importante propriedade dos tensoativos (RUCKENSTEIN e NAGARAJAN, 1975; HOLMBERG *et al.*, 2003). Uma solução contendo tensoativo acima da sua CMC significa que micelas podem ser encontradas no interior da solução e que as interfaces existentes estão saturadas por moléculas de tensoativo. O valor da CMC é determinado pelo balanço entre as forças de repulsão entre as partes polares e as forças de atração entre as partes hidrofóbicas. Este valor é reduzido quando a repulsão entre as partes polares é diminuída (TALHOUT e ENGBERTS, 1997).

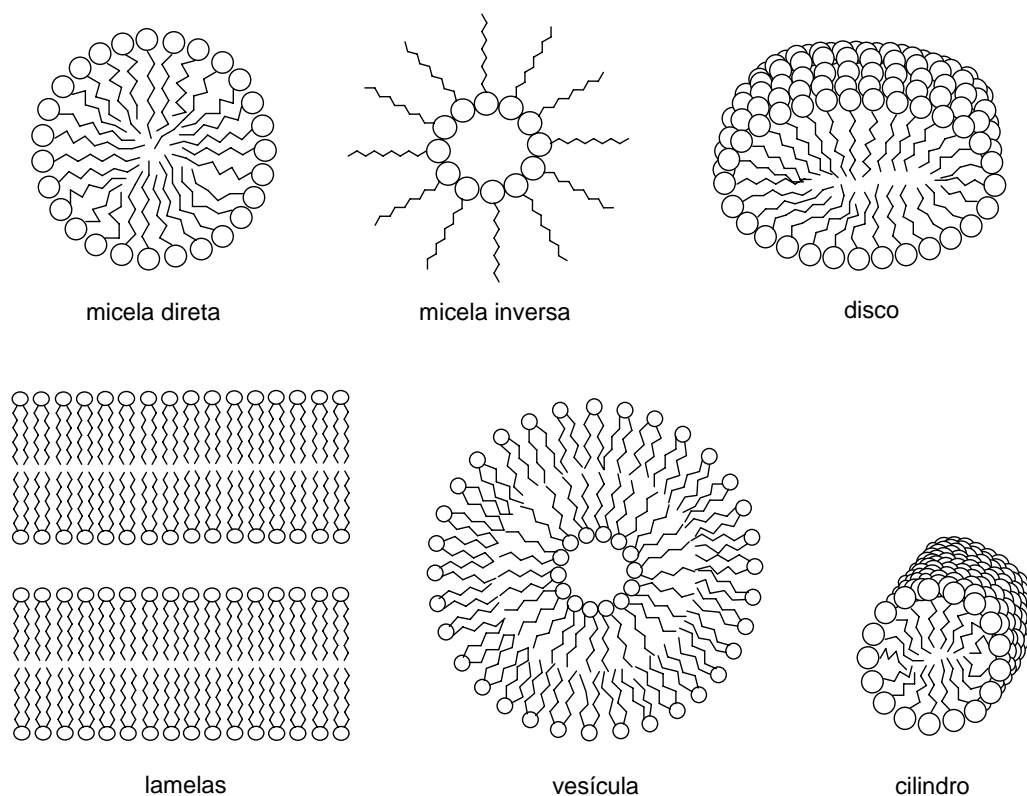


Figura 2.5 – Representação esquemática de agregados formados por tensoativos em solução aquosa

A concentração micelar crítica pode ser determinada experimentalmente a partir de diferentes propriedades físico-químicas. O ponto de inflexão apresentado em todas as curvas corresponde ao início da formação de agregados moleculares, os quais interferem nas propriedades da solução (Figura 2.6).

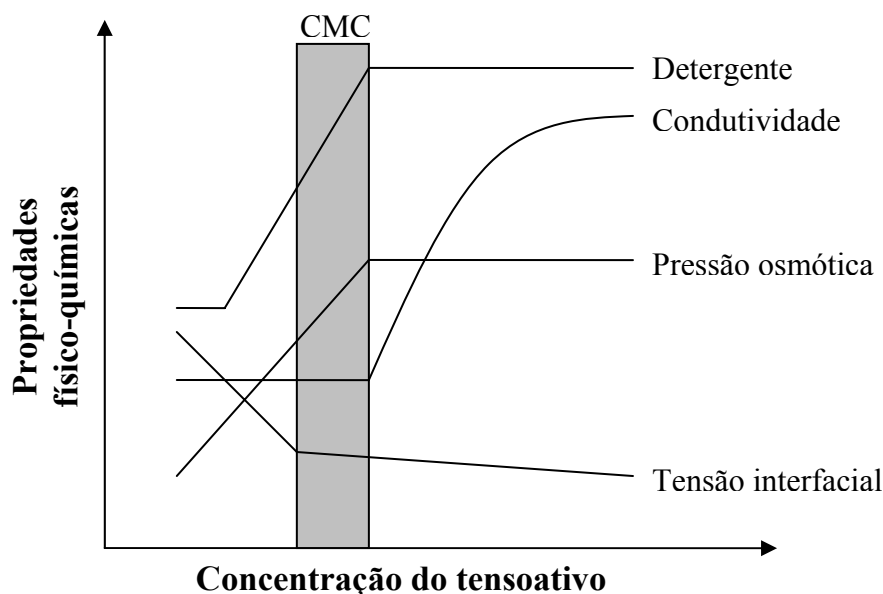


Figura 2.6 – Representação gráfica para a determinação da CMC a partir de diferentes parâmetros físico-químicos

Os agregados moleculares de tensoativos e suas moléculas isoladas (monômeros) encontram-se em equilíbrio associação-dissociação, e a lei da ação das massas pode ser aplicada. Do ponto de vista cinético, a associação dos monômeros em agregados moleculares se dá a partir de dois processos: um lento (10^{-3} s) correspondente à desagregação total do agregado molecular, e outro rápido (10^{-6} s) que traduz a duração da presença de um monômero no interior do agregado. A micelização, portanto, é um fenômeno dinâmico, em que os monômeros continuamente se interconvertem em micelas e vice-versa (BLANZAT, 2000).

Uma das principais propriedades das soluções de tensoativos é a capacidade de aumentar a solubilidade de solutos lipofílicos em água. A solubilização é consequência da presença de domínios hidrofóbicos nos agregados micelares que atuam como microambiente propício para a localização de compostos lipofílicos. Quando o formato dos agregados micelares permanece inalterado com a adição do soluto lipofílico, tem-se a formação de micelas inchadas, onde as moléculas do soluto encontram-se na camada interfacial de tensoativos, aumentando o tamanho dos agregados. Quando o soluto lipofílico solubilizado forma uma fase ou domínio no interior da micela, os agregados são designados de microemulsão (NAGARAJAN e RUCKENSTEIN, 1991).

2.3.1.1 Termodinâmica de micelização em solução aquosa

A formação de micelas pode ser visto como um mecanismo alternativo ao processo de adsorção de moléculas anfífilas em uma interface, já que para ambos os processos o principal fator é a remoção do contato entre grupos hidrofóbicos do tensoativo e a água, reduzindo, dessa forma, a energia livre do sistema. O efeito hidrofóbico é responsável pelos processos espontâneos de adsorção interfacial e de auto-associação das moléculas de tensoativo, que estão associados à remoção da cauda hidrofóbica do contato com a água (TANFORD, 1980).

O efeito hidrofóbico também pode ser compreendido a partir do efeito causado pela presença de grupos hidrofóbicos nas interações água-água (IUPAC, 1997). Antes do processo de micelização, as moléculas de água localizadas ao redor da parte hidrofóbica do tensoativo (primeira camada de solvatação) adotam uma conformação rígida, de modo a permitir a existência de uma mínima rede de ligações de hidrogênio (CHANDLER, 2005). Durante a micelização, diminui o contato das partes hidrofóbicas com o meio aquoso, liberando as moléculas de água de uma arquitetura intermolecular rígida, favorecendo o aumento de entropia do sistema.

A energia livre associada à solvatação de uma molécula anfífila em meio aquoso ou no interior do agregado micelar pode ser aproximada considerando os componentes individuais da energia livre nas partes hidrofílicas e hidrofóbicas do tensoativo. Antes que as primeiras micelas sejam formadas após a saturação das interfaces, moléculas isoladas de tensoativos (monômeros) se encontram dispersas no interior de um sistema aquoso. Após a micelização, a parte hidrofílica do tensoativo permanece interagindo com o meio aquoso, enquanto as partes hidrofóbicas adotam uma conformação no interior da micela direta que evita o contato com a água. Desse modo, a energia livre da parte hidrofílica permanece constante durante a micelização porque sempre estará em contato com a água, e a energia livre de micelização pode ser aproximada ao valor da energia livre que corresponde à transferência da parte hidrofóbica do tensoativo do meio aquoso para o interior do agregado micelar. Termodinamicamente, a energia livre é definida pela expressão:

$$\Delta G = \Delta H - T\Delta S \quad (1)$$

De acordo com a equação (1), a energia livre pode ser decomposta nos termos entálpico (H) e entrópico (S). Durante a micelização, o termo entálpico está associado à minimização do contato interfacial água-óleo (transferência das cadeias lipofílicas do tensoativo de um

solvente polar para o interior hidrofóbico do agregado) e à formação de novas ligações de hidrogênio ou interações dipolo-dipolo entre as partes polares dos tensoativos e a água, bem como de interações dipolo induzido-dipolo induzido entre as partes hidrofóbicas do tensoativo. No caso de tensoativos iônicos, a repulsão das partes polares (associada com as repulsões eletrostáticas ou estéricas entre os grupos polares hidratados) contribui negativamente para a entalpia de micelização. À temperatura ambiente, a contribuição entálpica para a micelização é pequena, e torna-se mais significativa com o aumento da temperatura (PAULA *et al.*, 1995). O termo entrópico está associado à agregação das moléculas anfífilicas (diminuição da entropia) e à quebra da rígida configuração entre as moléculas de água ao redor dos monômeros (aumento da entropia) (BLANZAT, 2000; MARQUES *et al.*, 2003; BRASHER *et al.*, 1995). Ou seja, a diminuição da entropia do sistema micelar é devida à transferência de calor, durante o fenômeno da agregação dos tensoativos, para a vizinhança, de acordo com a equação (2):

$$dS = \frac{dQ_{\text{rev}}}{T}; \quad \Delta S = \int_P^F \frac{dQ_{\text{rev}}}{T} \quad (2)$$

Uma maneira simples de relacionar a estrutura geométrica de um tensoativo com o tipo de agregado preferencial a ser formado é o parâmetro de empacotamento P (ISRAELACHVILI, 1976). Este parâmetro é uma quantidade adimensional definida pela expressão $P = V/a_0l = a_{\text{hc}}/a_0$, em que V é o volume da cadeia hidrocarbônica, a_0 é a área ótima ocupada pela cabeça polar na interface polar-apolar, e l é o comprimento crítico da cadeia (aproximadamente igual, porém menor do que o comprimento da cadeia hidrocarbônica totalmente estendida). O parâmetro P também pode ser visto como a razão entre a área da seção transversal da parte hidrocarbônica, a_{hc} , e a área interfacial da cabeça polar, a_0 .

O parâmetro de empacotamento, P , não contém qualquer grandeza molecular, e sim, quantidades que relacionam a presença de um tensoativo sob a “forma” de certo tipo de agregado definido. Se o tensoativo tem a “forma” de um cone, então ele tende a formar micelas esféricas, para as quais os valores de P são próximos de 1/3. Se o formato for similar a um cone truncado, serão formadas micelas cilíndricas, já que $P \approx 1/3-1/2$. Para os tensoativos com formato cilíndrico, o tipo de agregado mais estável são as bicamadas, em que $P \approx 1$. Em micelas com formato de disco, bem como em vesículas, os valores de P se encontram em um intervalo entre 0,5–1. Por fim, se o tensoativo apresenta o formato de um cone truncado e invertido, tenderá a formar estruturas inversas, para as quais $P > 1$ (Figura 2.7). Dessa forma, variando-se o comprimento da cadeia alquílica ou a sua fluidez (através da variação de temperatura, por exemplo), o volume hidrocarbônico ou a área da cabeça polar,

pode-se, em princípio, prever qual tipo de agregado será formado sob condições pré-definidas. Para tensoativos iônicos, por exemplo, a diminuição das interações repulsivas entre as cabeças polares, induzida pela adição de um sal, irá reduzir o valor de a_0 , aumentar V/a_0l , e causar uma transição entre micelas esféricas para micelas cilíndricas (NINHAM *et al.*, 1983).

Para a obtenção de vesículas, cujo pré-requisito é $1/2 < V/a_0l < 1$, utiliza-se geralmente, tensoativos bicatenários, já que suas duas caudas hidrofóbicas, em conjunto, apresentam grande volume hidrocarbônico, V . Entretanto, no caso de tensoativos cataniônicos (mistura equimolar de tensoativos iônicos de cargas opostas), a atração eletrostática entre as cabeças polares dos dois tensoativos iônicos gera, aparentemente, um tensoativo pseudo-zwiteriônico bicatenário, resultando em uma menor área efetiva da cabeça polar, com ampliação da região hidrofóbica, quando comparado com os tensoativos isolados (KALER *et al.*, 1992). Nesse caso, observa-se também, a formação de estruturas vesiculares ao invés de micelas esféricas ou cilíndricas.

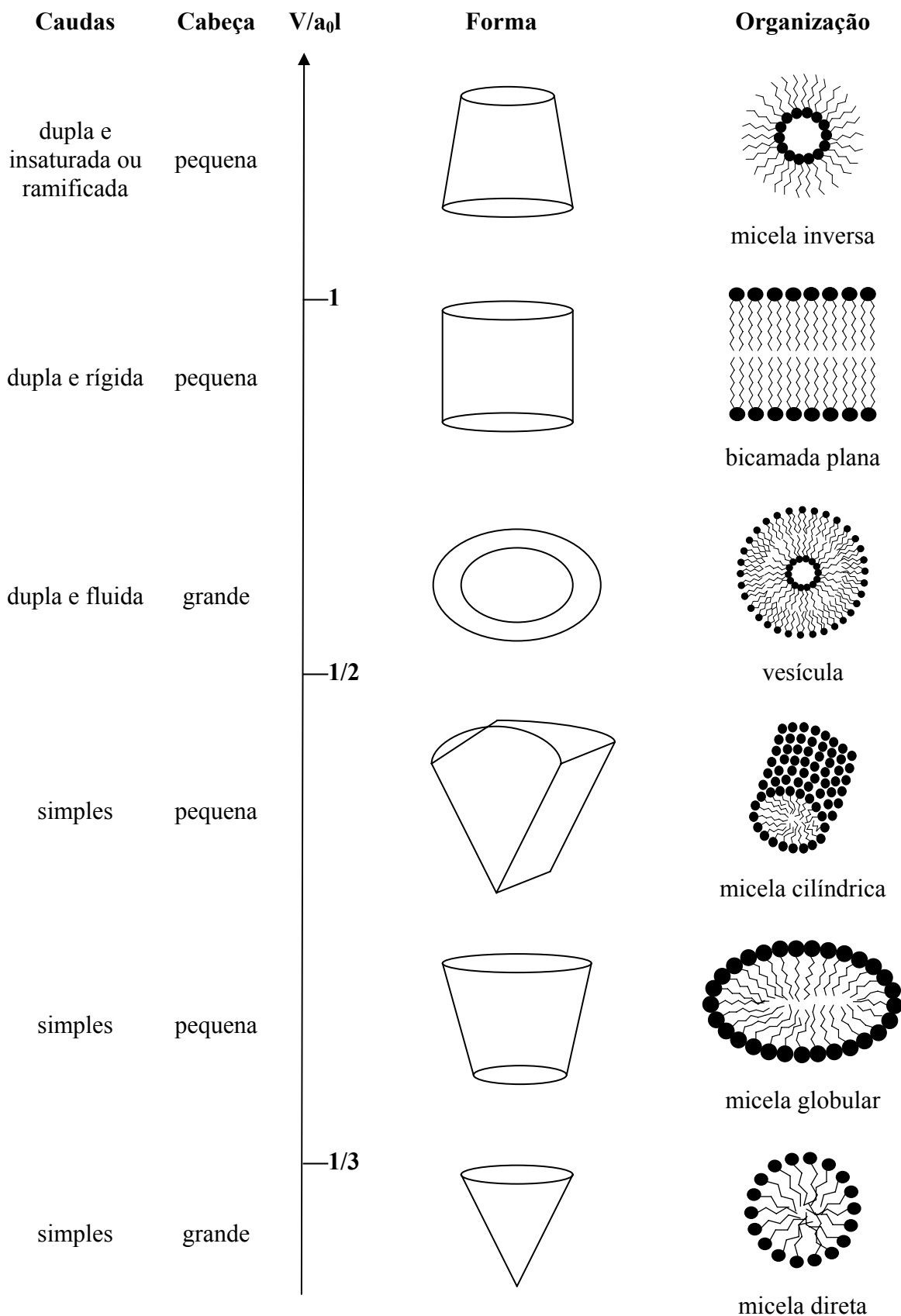


Figura 2.7 – Representação esquemática dos agregados em função do parâmetro de empacotamento

2.2 MICROEMULSÕES

Quando um óleo é disperso em uma fase aquosa sem nenhum outro tipo de aditivo, a estabilidade das gotículas formadas é muito pequena, e elas tendem a se fundirem (coalescerem) até a total separação de fases. A adição de tensoativo a esta mistura permite a criação de um filme na interface óleo-água e a formação de dispersões coloidais denominadas emulsões e microemulsões. Emulsões são sistemas instáveis que tendem à separação de fases, e que apresentam pequena curvatura da camada interfacial e que, por isso, geram gotículas de tamanho relativamente grande (1-10 μm). A produção de emulsões geralmente requer o uso de quantidade moderada de tensoativo. Microemulsões, por sua vez, são sistemas considerados termodinamicamente estáveis, já que não tendem à separação de fases. Apresentam camada interfacial com grande curvatura e agregados com tamanho nanométrico (~ 10 nm). As microemulsões são consideradas sistemas altamente dinâmicos e para sua formação são necessárias grandes quantidades de tensoativo e, usualmente, a adição de um cotensoativo (HOLMBERG *et al.*, 2003).

O conceito de microemulsão foi introduzido na literatura nos anos de 1940 por HOAR e SCHULMAN (1943) ao descreverem a produção de uma solução transparente ou translúcida a partir da titulação de uma emulsão com hexanol. Entretanto, apenas no final dos anos de 1950, foi que SCHULMAN *et al.* (1959) estabeleceram o termo microemulsão, que ao longo dos anos, tem sido definido e redefinido em função dos avanços tecnológicos. Atualmente, considera-se que as microemulsões são dispersões coloidais termodinamicamente estáveis e opticamente isotrópicas constituídas de um ou mais agentes tensoativos, uma fase polar, uma fase oleosa (orgânica), e frequentemente, um cotensoativo, que pode ser um álcool ou amina de cadeia média (MOULIK e PAUL, 1998; KLIER *et al.*, 2000). Ao contrário das emulsões, as microemulsões requerem menor quantidade de energia mecânica para sua preparação, já que são formadas espontaneamente após pouco tempo de agitação.

Quando tensoativos são adicionados a uma mistura imiscível de água e óleo, as moléculas do tensoativo tendem se localizar na interface óleo/água, que é termodinamicamente mais favorável, reduzindo, dessa forma, a tensão nesta interface a valores muito próximos de zero, e gerando microdomínios de água e óleo separados por extensas interfaces internas constituídas de moléculas do tensoativo (VOLLMER, 1999). Estes microdomínios ou microestruturas compreendem microgotículas da fase dispersa em uma fase contínua, com tamanho variando entre 15 e 200 nm (ESPOSITO *et al.*, 2003).

As microemulsões são sistemas dinâmicos, onde processos de agregação e desagregação operam simultaneamente, em que a interface flutua espontânea e continuamente em função da razão e natureza de seus componentes e da temperatura, gerando diversos tipos de microestruturas (Figura 2.5). Estes processos envolvem a troca contínua de matéria entre as diferentes fases, resultando em um equilíbrio global, e compreendem o intercâmbio de: (i) moléculas de água nos seus estados livre e associado, (ii) contra-íons entre as partes polares do tensoativo e o meio aquoso, (iii) moléculas do cotensoativo entre o filme interfacial e a fase contínua ou dispersa, e (iv) moléculas do tensoativo entre o filme interfacial e a fase aquosa (MOULIK e PAUL, 1998).

As microemulsões apresentam microestruturas que podem ser constituídas de microgotículas de óleo em água (microemulsões do tipo O/A) ou de água em óleo (microemulsões do tipo A/O) (Figura 2.8). As primeiras são observadas quando a fração de volume do óleo é baixa em comparação à água, e as últimas quando a fração de volume da água é pequena. Quando as quantidades de água e óleo em um sistema microemulsionado forem similares, podem ser observadas estruturas bicontínuas, em que a água e o óleo coexistem como fase contínua na presença de uma interface estabilizada por moléculas do tensoativo.

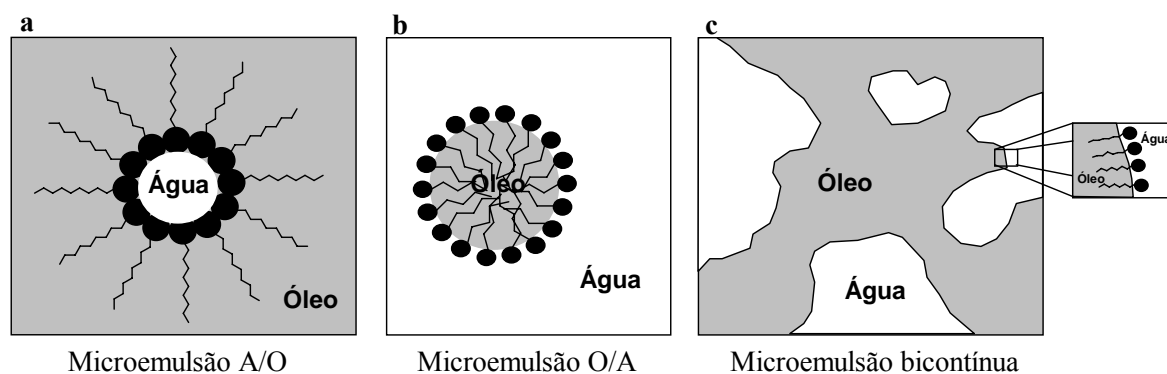


Figura 2.8 – Representação esquemática das três microestruturas mais comumente encontradas em sistemas microemulsionados: (a) microemulsão água em óleo; (b) microemulsão óleo em água; (c) microemulsão bicontínua

2.2.1 Formação de microemulsões

A formação e a estabilidade das microemulsões são justificadas por variadas teorias, algumas das quais estão baseadas em interações envolvendo o filme interfacial

(ISRAELACHVILI, 1976), e outras em aspectos termodinâmicos (KAHLWEIT *et al.*, 1990; PECK *et al.*, 1991; SKAF e STELL, 1992). Para ambos os tipos de teorias, a formação das microemulsões deriva essencialmente da redução da tensão na interface água/óleo, da formação de um filme interfacial fluido composto de moléculas do tensoativo, e da penetração e associação de moléculas da fase oleosa neste filme de tensoativos (SCHULMAN *et al.*, 1959). No entanto, geralmente se faz necessária a presença de um cotensoativo para que o filme interfacial se torne mais flexível e alcance valores de tensão inferiores a 1 mN/m. Devido à maior flexibilidade do filme interfacial por causa da inclusão de um cotensoativo, pode ocorrer a expansão da região de ocorrência de microemulsões em sistemas contendo tensoativo, água e fase oleosa. A formação de microemulsões sem a presença de cotensoativo é possível quando o volume da parte hidrofóbica do tensoativo é pequeno, ou quando a cadeia lipofílica apresenta grupos fluidizantes, como insaturações. Nestes casos, a presença do cotensoativo não é necessária e a composição da microemulsão restringe-se aos outros três componentes (LV *et al.*, 2006; WARISNOICHAROEN *et al.*, 2000).

Admitindo-se uma racionalização termodinâmica simplificada, considera-se que a energia livre de formação da microemulsão depende de dois fatores: (i) da capacidade do tensoativo em reduzir a tensão superficial na interface água/óleo, e (ii) da variação de entropia do sistema, os quais estão sumariamente apresentados na equação abaixo:

$$\Delta G_f = \gamma \cdot \Delta A - T \cdot \Delta S, \quad (3)$$

em que ΔG_f é a energia livre de formação, γ é a tensão superficial na interface água/óleo, ΔA é variação da área interfacial durante o processo de microemulsificação, ΔS é a variação de entropia do sistema, e T é a temperatura. Como o aumento da área interfacial, ΔA , é imprescindível para a formação de gotículas de água em óleo, ou óleo em água, a estabilidade das microemulsões advém do aumento de entropia devido à mistura de uma fase em outra na forma de um grande número de pequenas gotículas. No entanto, espera-se que contribuições favoráveis de entropia também derivem de outros processos dinâmicos como a difusão de moléculas de tensoativo na camada interfacial e o contínuo intercâmbio das moléculas de tensoativo nos domínios monômero-micela (LAWRENCE e REES, 2000).

2.2.2 Diagramas de fases

A mistura entre água, óleo e tensoativo(s) é capaz de gerar uma extensa variedade de estruturas e fases (Figura 2.8). Além das microemulsões, podem também existir emulsões, fases cúbicas ou hexagonais cristalinas e estruturas lamelares em misturas contendo tensoativo, água e fase oleosa, dependendo da quantidade e da natureza de cada componente do sistema. A relação entre a formação de diversas fases e estruturas de uma mistura e sua composição pode ser visualizada com o auxílio de um diagrama de fases, que são sistemas ternários onde cada vértice do diagrama representa 100% de um determinado componente. Ocasionalmente, as microemulsões podem conter componentes adicionais como cotensoativos, aditivos e fármacos, os quais podem influenciar na formação das microestruturas observadas. Nestes casos, quando quatro ou mais componentes são estudados, diagramas de fases pseudo-ternários são usados, nos quais um dos vértices do diagrama estará representando uma mistura binária de razão fixa como tensoativo/cotensoativo, água/fármaco ou fase oleosa/fármaco (Figura 2.9a).

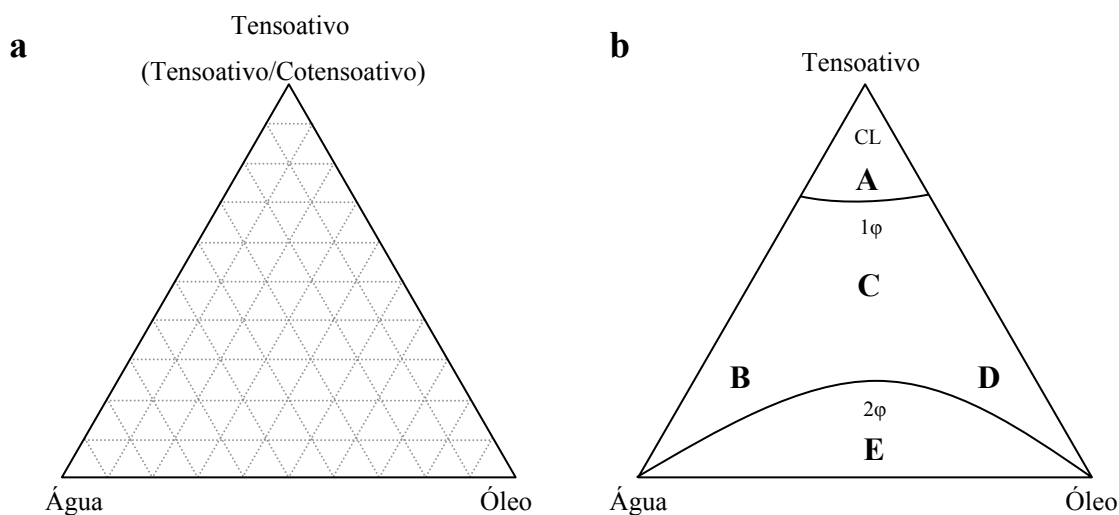


Figura 2.9 – (a) Representação esquemática de um diagrama de fases pseudo-ternário. (b) Diagrama de fases pseudo-ternário hipotético onde estão representadas as regiões de microemulsão (1ϕ), de emulsão ou duas fases (2ϕ) e cristais líquidos (CL)

A construção de diagramas de fases pode requerer um gasto dispendioso de tempo, principalmente quando um dos objetivos é delinear com precisão os limites de cada fase. Além disso, sonicação e aquecimento podem ser utilizados para se alcançar rapidamente o

equilíbrio, principalmente quando são usados tensoativos não-iônicos (WARISNOICHAROEN *et al.*, 2000). A metodologia mais prática para a construção de diagramas de fases envolve a preparação de uma série de misturas binárias e a sua posterior titulação com um terceiro componente, avaliando-se aspectos físicos da mistura após cada adição do titulante (DJORDJEVIC *et al.*, 2004).

Alguns cuidados, no entanto, devem ser tomados com relação ao controle da temperatura e ao tempo de espera para que o sistema atinja o equilíbrio, a fim de que não ocorram discrepâncias no diagrama de fases. Estes cuidados são aplicados, sobretudo, quando são utilizados tensoativos não-iônicos, já que são muito susceptíveis à temperatura, ocorrendo, portanto, a diminuição de sua solubilidade com o aumento da temperatura. Esta classe de tensoativos apresenta ainda uma temperatura de inversão de fase, conhecida como PIT (*phase inversion temperature*), que é a temperatura em que um tensoativo solúvel em água torna-se solúvel em óleo, tornando-se, portanto, incapaz de formar microemulsões do tipo O/A. Se a PIT for muito próxima da temperatura de utilização da microemulsão, ela pode se tornar um fator limitante para a sua aplicação (WARISNOICHAROEN *et al.*, 2000).

A análise de um diagrama de fases pode revelar variadas regiões em que podem ser encontrados diversos tipos de agregados, e que podem assumir diferentes tamanhos, dependendo da concentração e natureza dos componentes, da razão tensoativo/cotensoativo e da temperatura do sistema (Figura 2.9b). Em misturas muito ricas em tensoativo (região A) há a tendência da formação de cristais líquidos (ALANY *et al.*, 2001) e estruturas lamelares, em que o tensoativo e o cotensoativo organizam-se sob a forma de bicamadas na interface água/óleo, separando ambas as fases. Esta região é caracterizada por misturas viscosas, e em alguns casos pode ser observada a formação de géis (ALVAREZ-FIGUEROA e BLANCO-MÉNDEZ, 2001).

Na região próxima ao vértice da água (região B), podem ser observadas microgotículas de óleo dispersas no meio aquoso (microemulsões do tipo O/A), desde que a concentração de tensoativos seja suficiente para formar filmes interfaciais fluidos. A diluição infinita com a fase aquosa tende a formar micelas diretas. O outro extremo do diagrama, próximo ao vértice da fase oleosa (região D), é caracterizado pela presença de microgotículas de água dispersas na fase oleosa (microemulsões do tipo A/O), sendo o volume da fase interna pequeno. A diluição infinita com a fase oleosa tende a formar micelas inversas, com a fase aquosa dissolvida em seu interior. Entre essas duas regiões pode existir uma região intermediária (região C), em que podem ser observadas fases bicontínuas, caracterizadas por extensas fases de água e óleo separadas por um filme interfacial composto por tensoativo e cotensoativo. Já

nas composições próximas ao eixo binário água-óleo (região E), a quantidade de tensoativo torna-se insuficiente para facilitar a formação de microemulsões. Nesta região, fases múltiplas podem existir, tais como: emulsões, emulsões em equilíbrio com a fase aquosa ou oleosa, microemulsões em equilíbrio com a fase aquosa ou oleosa, e sistemas trifásicos.

2.2.3 Aplicação das microemulsões

Devido às suas propriedades físico-químicas singulares, tais como capacidade de formar espontaneamente microestruturas em misturas imiscíveis, estabilidade termodinâmica e fácil preparação, as microemulsões têm sido aplicadas na recuperação de petróleo (DANTAS *et al.*, 2001), na remoção de hidrocarbonetos no solo e na água (OLIVEIRA *et al.*, 2004), na síntese de nanopartículas (LÓPEZ-QUINTELA, 2003), como meio reacional para síntese de diversos materiais (ENGBERTS *et al.*, 2006), na extração de metais pesados (DANTAS *et al.*, 2005) e de cor de efluentes industriais (DANTAS *et al.*, 2004), na solubilização e proteção de moléculas ativas como pigmentos e substâncias perigosas (GARTI *et al.*, 2004), em formulações de limpeza, cosméticos e alimentos (FLANAGAN e SINGH, 2006), e como espermicidas (D'CRUZ *et al.*, 2001). Além dessas aplicações, as microemulsões têm sido recentemente utilizadas na veiculação de fármacos (LAWRENCE e REES, 2000; OLIVEIRA *et al.*, 2004; FORMARIZ *et al.*, 2005), que juntamente com outros sistemas como os lipossomos e as nanopartículas, contribuem para a biodisponibilização de fármacos.

2.2.4 Microemulsões como sistemas de liberação de fármacos

Quando um fármaco é administrado a um indivíduo, ele é absorvido e distribuído por todo o seu corpo. No entanto, apenas uma pequena parte da dose administrada alcança o seu sítio de ação farmacológico. A fração restante pode agir em outras partes do organismo e provocar efeitos adversos. A utilização dos sistemas de liberação de fármacos visa diminuir a incidência desses efeitos adversos e aumentar o índice terapêutico dos fármacos, através da sua liberação controlada em sítios específicos e/ou a taxas constantes. Nesse aspecto, as microemulsões apresentam propriedades e vantagens peculiares. A existência de

microdomínios de diferentes polaridades no interior de uma solução unifásica permite a solubilização tanto de fármacos hidrossolúveis quanto lipossolúveis, ou até de ambos ao mesmo tempo (LEE *et al.*, 2003). Em geral, fármacos lipofílicos tendem a se localizar no interior das microemulsões O/A ou na região hidrofóbica das moléculas do tensoativo que formam a camada interfacial, onde em ambos os casos a liberação do fármaco será lenta. No caso de microemulsões do tipo A/O, a incorporação de um fármaco lipofílico geralmente se dá na fase contínua oleosa ou mesmo na camada interfacial, mas nesse caso espera-se uma liberação mais rápida do fármaco. Por sua vez, os fármacos hidrofílicos tendem a se encontrar predominantemente no interior das microemulsões do tipo A/O ou na fase aquosa dispersa de microemulsões do tipo O/A. Neste caso, a sua liberação será mais rápida em sistemas do tipo A/O.

As microemulsões também apresentam a vantagem de aumentar a biodisponibilidade de certos fármacos, seja através da solubilização de fármacos pouco solúveis (KAWAKAMI *et al.*, 2002), ou pela proteção contra a hidrólise enzimática (LYONS *et al.*, 2000), possibilitando a redução da dose administrada, garantindo além de vantagens econômicas, a diminuição de possíveis efeitos adversos. Nesse contexto, estudos estão sendo realizados para que certas substâncias tóxicas, como a camptotecina (CORTESE *et al.*, 1997) e o metotrexato (ALVAREZ-FIGUEROA e BLANCO-MÉNDEZ, 2001), possam ser veiculados a partir de microemulsões para o tratamento de tumores malignos.

Adicionalmente, as microemulsões podem atuar ainda como um sistema reservatório para o fármaco, garantindo a sua liberação lenta e a prolongação do seu efeito farmacológico (DALMORA *et al.*, 2001). Como exemplo, foi comprovado que microemulsões ricas em colesterol tendem a se concentrar em certos tumores sólidos, garantindo a liberação de agentes antineoplásicos em seu sítio de ação farmacológico (AZEVEDO *et al.*, 2005).

A liberação do fármaco a partir dos sistemas microemulsionados pode seguir dois mecanismos básicos (BONACUCINA *et al.*, 2009), a depender do tipo de microemulsão, da via de administração e da natureza do fármaco. No primeiro mecanismo, a fase oleosa pode atuar como um sistema reservatório, no caso de microemulsões do tipo O/A, ou como uma barreira externa difusora em microemulsões do tipo A/O. Em ambos os casos, ocorre liberação lenta e prolongada do fármaco (DALMORA *et al.*, 2001). Pelo outro mecanismo, através da via oral, o fármaco pode ser liberado do sistema microemulsionado a partir da fagocitose das gotículas de óleo contendo um fármaco lipofílico, aumentando, assim, a biodisponibilidade de fármacos pouco solúveis em água (BONACUCINA *et al.*, 2009).

A aplicação de sistemas microemulsionados como veículos para fármacos depende não apenas da natureza do fármaco, mas também da via pela qual o fármaco em questão será administrado. Diversas características das microemulsões podem limitar seu uso por determinada via de administração, mas, por outro lado, podem contribuir para sua veiculação por outra via. Assim, por exemplo, a via parenteral (intravenosa) requer o uso de microemulsões do tipo O/A, a fim de se evitar o risco de embolia causada pela inversão e aumento das gotículas (FORMARIZ *et al.*, 2005; PARK *et al.*, 1999), e microemulsões viscosas do tipo A/O são preferidas para a administração transdérmica (SPICLIN *et al.*, 2003). Para a administração oral é recomendado o uso de sistemas microemulsionados resistentes à diluição, como os sistemas auto-microemulsificantes (NARANG *et al.*, 2007). Dessa forma, é imprescindível o conhecimento prévio da natureza do fármaco a ser microemulsionado, bem como das vias em que esse fármaco será administrado a fim de se obter um sistema microemulsionado otimizado. Além desses dois fatores, existe um terceiro, igualmente importante: os componentes utilizados nas microemulsões para uso biológico devem ser farmacologicamente aceitáveis.

2.2.4.1 Componentes de microemulsões

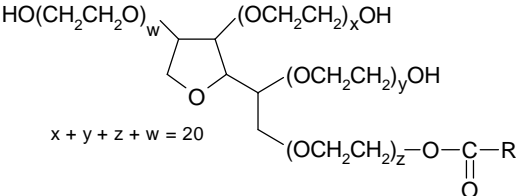
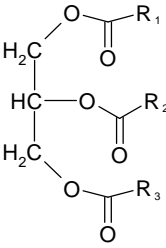
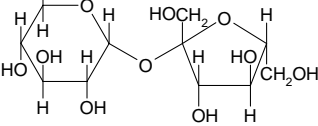
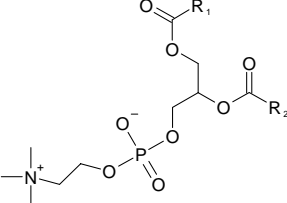
Apesar das muitas vantagens, as microemulsões apresentam desvantagens que podem limitar o seu uso como sistemas de liberação de fármacos. A principal delas consiste no fato de que a maioria dos componentes comumente utilizados para a formação de microemulsões não são farmacologicamente aceitáveis. Em alguns casos, para que microemulsões sejam formadas são necessárias grandes quantidades de tensoativo, que nessas condições podem gerar efeitos toxicológicos significativos, além de elevar o custo final da formulação. Desta forma, a escolha dos componentes de uma microemulsão para uso farmacológico requer um balanço entre três fatores: a escolha de compostos que sejam capazes de formar microemulsões, que sejam atóxicos, e que preencham todos os requisitos para um bom veículo.

2.2.4.1.1 Tensoativos em microemulsões biológicas

Os tensoativos desempenham um papel fundamental na formação do filme interfacial, gerando domínios de fase aquosa e oleosa. Para que este filme seja estável e alcance valores de tensão próximos de zero são necessárias grandes quantidades de tensoativo, correspondendo, na maioria dos casos, a no mínimo 30% em massa da microemulsão. Portanto, a aplicação de microemulsões como sistema de liberação de fármacos requer a utilização de tensoativos atóxicos e biodegradáveis. Neste caso, tensoativos não-iônicos e anfóteros são preferíveis frente aos iônicos, pois além de serem menos tóxicos, são também menos susceptíveis ao pH e à presença de eletrólitos, além de apresentarem CMC mais baixa.

Os tensoativos anfóteros de ocorrência natural, como as lecitinas, são considerados biologicamente atóxicos (FIUME, 2001) e por isso têm sido largamente empregados na formulação de microemulsões para uso farmacêutico (PARK *et al.*, 1999; PAOLINO *et al.*, 2002; MORENO *et al.*, 2003; CHANGEZ *et al.*, 2006). As lecitinas são predominantemente hidrofóbicas devido à presença de duas caudas apolares, no entanto, apresentam também hidrofilia moderada proveniente dos grupos polares zwitteriônicos presentes em sua estrutura (Tabela 2.1). Como as lecitinas são bastante lipofílicas para formar espontaneamente o filme interfacial, imprescindível para a formação da microemulsão, faz-se necessária, geralmente, a adição de um cotensoativo para viabilizar a formação de microemulsões à base de lecitinas, o que pode acarretar em um aumento da toxicidade da formulação (PARK *et al.*, 1999). No entanto, para evitar o uso do cotensoativo, uma opção viável seria a utilização de uma mistura de lecitina com um tensoativo não-iônico (MORENO *et al.*, 2003).

Tabela 2.1 – Estrutura química de alguns dos principais tensoativos farmacologicamente aceitáveis

Tensoativos	Estrutura química
Tween 80 (Polissorbato 80) <i>Monooleato de polioxietileno (20) sorbitano</i>	$R = C_{17}H_{33}$ 
Tween 20 (Polissorbato 20) <i>Monolaurato de polioxietileno (20) sorbitano</i>	$R = C_{11}H_{23}$
Span 80 <i>Monooleato de sorbitano</i>	$R = C_{17}H_{33}$
Span 20 <i>Monolaurato de sorbitano</i>	$R = C_{11}H_{23}$
Poloxâmeros <i>Polietileno-polipropileno glicol</i>	$H-[O-CH_2-CH_2]_a-[O-CH(CH_3)-CH_2]_b-[O-CH_2-CH_2]_a-O-H$
Cremonphor EL <i>Óleo de ricino polietoxilado</i>	$R_{1,2,3} = (CH_2)_6-CH=CH-CH_2-CH_2-(CH_2)_6-CH_3$ $(OCH_2CH_2)_{x,y,z}OH$ R = Polietilenoglicol ricinoleato $x + y + z = 35$ $R_{1,2,3} = (CH_2)_9-CH_2-CH_2-CH_2-CH_2-(CH_2)_6-CH_3$ $(OCH_2CH_2)_{x,y,z}OH$ 
Cremonphor RH 40 <i>Óleo de ricino hidrogenado polietoxilado</i>	R = Polietilenoglicol 12-oxiestearato $x + y + z = 40$
Monoestearato de sacarose <i>Éster da sacarose</i>	$CH_3(CH_2)_{16}COOCH_2$ 
Fosfatidilcolina <i>Lecitina</i>	R = grupos alquil (C₁₂-C₁₈) 

Os tensoativos não-iônicos, por sua vez, podem ser utilizados como alternativa aos fosfolípidios (lecitinas), já que apresentam baixa toxicidade em concentrações moderadas.

Dentre eles, destacam-se os ésteres do sorbitol (Tweens e Spans), os compostos polietoxilados (alquil-poliéteres, Brij, Poloxâmeros e Cremophor) e os glicerídeos (Labrasol) (Tabela 2.1). Todos são amplamente empregados em microemulsões para uso tópico (CHEN *et al.*, 2004; SINTOV e SHAPIRO, 2004; HUA *et al.*, 2004) e oral (KIM *et al.*, 2001; ZHENG e FULU, 2006; KIM *et al.*, 2005), mas praticamente apenas os polissorbatos possuem toxicidade tolerável para uso parenteral (PARK e KIM, 1999) e ocular (ALANY *et al.*, 2006). Mesmo assim, os tensoativos não-iônicos são desaconselhados em formulações de uso crônico, visto que além de apresentarem certa toxicidade, não são facilmente eliminados pelo organismo. Atualmente, tensoativos mais biodegradáveis, como os ésteres de sacarose (Tabela 2.1), vêm sendo estudados e utilizados em sistemas microemulsionados para uso farmacológico (GARTI *et al.*, 1999; BOLZINGER *et al.*, 1998).

Uma propriedade importante e determinante para a formação das microestruturas de microemulsões contendo tensoativos não-iônicos é o balanço hidrófilo-lipófilo (BHL), que leva em consideração a contribuição relativa das partes hidrofílica e hidrofóbica da molécula do tensoativo. Geralmente, tensoativos com baixo BHL (3-6) tendem a formar microemulsões do tipo A/O, enquanto que tensoativos com altos valores de BHL (8-18) são preferíveis na formação de microemulsões do tipo O/A. Tendo em vista esta propriedade dos tensoativos não-iônicos, vários estudos estão sendo realizados utilizando misturas de tensoativos com BHL distintos no intuito de eliminar o uso de cotensoativo (LI *et al.*, 2005; KIM *et al.*, 2005), melhorar as propriedades físico-químicas da microemulsão (CONSTANTINIDIS e SCALART, 1997), aumentar a região de microemulsão no diagrama de fase (KIM *et al.*, 2005) e formar microestruturas distintas daquelas que seriam formadas utilizando-se os tensoativos individualmente (efeito sinérgico dos tensoativos) (PORRAS *et al.*, 2004).

2.2.4.1.2 Cotensoativos em microemulsões biológicas

Os cotensoativos são geralmente constituídos de moléculas polares que possuem uma pequena cauda hidrofóbica, como os alcoóis e as aminas de cadeia média, que apresentam variadas funções, tais como: (i) diminuição da tensão interfacial água-óleo (permitindo a formação de microemulsões); (ii) estabilização do filme de tensoativo formado (aumentando a sua fluidez); (iii) bloqueio do surgimento de fases líquidas cristalinas (aumentando a região de microemulsão); (iv) permitir maior penetração da parte hidrofóbica do tensoativo na fase

oleosa (aumentando a entropia do sistema); e (v) diminuição das interações repulsivas das cabeças polares, no caso de tensoativos iônicos. Adicionalmente, a presença de um cotensoativo pode influenciar na solubilização do fármaco, principalmente em microemulsões ricas em fase oleosa, já que a molécula do cotensoativo irá competir com o fármaco por locais livres na região interfacial (GARTI *et al.*, 2006). Por outro lado, o uso de cotensoativos pode facilitar a solubilização de fármacos lipofílicos em microemulsões do tipo O/A, uma vez que torna o meio mais hidrofóbico a partir da diminuição da constante dielétrica da água (NARANG *et al.*, 2007).

Na maioria dos casos, a presença do cotensoativo pode inviabilizar a utilização biológica de uma microemulsão, tornando-a uma formulação farmacologicamente inaceitável. De fato, o emprego de alcoóis de cadeia média, como butanol e hexanol, pode resultar em um aumento significativo da toxicidade da formulação. Além disso, a solubilidade aquosa desses compostos em microemulsões do tipo O/A é frequentemente maior que a do tensoativo principal. Conseqüentemente, quando a microemulsão é diluída, o cotensoativo tende a migrar para a fase aquosa, diminuindo sua concentração na interface água-óleo, podendo desestabilizar as gotículas de microemulsão.

Alternativas para a utilização de alcoóis de cadeia média são alvo de interesse científico, e o emprego de pequenas moléculas polares se mostra uma opção viável. Etanol, por exemplo, tem sido utilizado como cotensoativo tanto em microemulsões do tipo O/A (RUTH *et al.*, 1995) quanto A/O (ZHANG *et al.*, 2005), por apresentar toxicidade mais tolerável que seus homólogos de cadeia maior (ALANY *et al.*, 2006). Alcoóis polihidroxilados, tais como sorbitol (KTISTIS, 1990) e propilenoglicol (RADOMSKA e DOBRUCKI, 2000; CHEN *et al.*, 2004), têm sido também utilizados como aditivos para facilitar a formação de microemulsões, bem como os poligliceróis comerciais Plurol Oleique® (DJORDJEVIC *et al.*, 2005) e Plurol Isostearique® (ESPOSITO *et al.*, 2003).

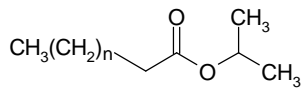
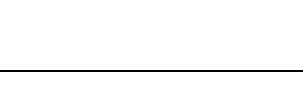
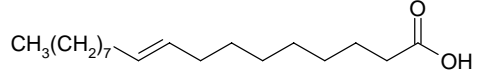
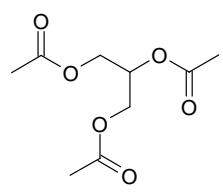
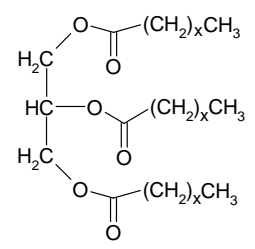
No entanto, dependendo da sua porcentagem na formulação, o uso destes cotensoativos em formulações farmacêuticas pode levar à ocorrência de efeitos adversos. Por outro lado, a necessidade do uso destes cotensoativos pode ser justificada pelo custo-benefício, ou seja, biodisponibilidade do fármaco ou gravidade da enfermidade com poucas opções de tratamento. Um exemplo clássico de que as vantagens são superiores aos efeitos adversos causados pelo uso de cotensoativos consiste na formulação comercial Norvir®, utilizada no tratamento da AIDS, que é um sistema auto-microemulsificante contendo 42% em massa de etanol (STRICKLEY, 2004).

2.2.4.1.3 Fase oleosa em microemulsões biológicas

A fase orgânica ou oleosa desempenha um papel importante tanto na formação da microemulsão como na solubilização do fármaco. Nem sempre o mesmo tipo de óleo gera condições favoráveis para ambos os casos. De fato, moléculas de óleo com grandes cadeias hidrocarbônicas podem não gerar microemulsões, pois suas moléculas não conseguem penetrar no filme de tensoativo e ajudar na sua fluidez e estabilização. Já as moléculas de óleo com cadeias hidrocarbônicas mais curtas apresentam maior facilidade de penetração do filme interfacial, porém, a capacidade de solubilização de fármacos, sobretudo os lipofílicos, pela fase orgânica é diminuída. Assim, um balanço entre essas duas propriedades deve ser levado em conta na escolha da fase oleosa a ser utilizada em microemulsões para uso farmacêutico.

A maioria dos óleos utilizados nas microemulsões para uso farmacêutico são volumosos e semi-polares, ao contrário dos óleos hidrocarbônicos (alcanos) que são comumente utilizados em outras aplicações. Dessa forma, os triglicerídeos de cadeia média e longa, como o Miglyol (VALENTA e SCHULTZ, 2004; AGATONOVIC-KUSTRIN *et al.*, 2003), e os ésteres de ácido graxo, como o miristato de isopropila (PODLOGAR *et al.*, 2005; MORENO *et al.*, 2003) e o palmitato de isopropila (DREHER *et al.*, 1997) são farmacêuticamente aceitáveis e bastante utilizados na obtenção de microemulsões (Tabela 2.2). Outro óleo bastante utilizado é o ácido oléico, que possui a propriedade de aumentar a permeação transdérmica (ESCRIBANO *et al.*, 2003) e a absorção enteral (ZHENG e FULU, 2006) de certos fármacos. Óleos vegetais, como óleo de soja (TEREK *et al.*, 2006), azeite de oliva (KAWAKAMI *et al.*, 2002), entre outros (KIM *et al.*, 2005), bem como a mistura de vários óleos (KAWAKAMI *et al.*, 2002; ACHARYA *et al.*, 2001) também podem ser empregados.

Tabela 2.2 – Estrutura química de alguns dos principais óleos farmacêuticamente aceitáveis

Óleo	Estrutura química
Miristato de isopropila (IPM) <i>Éster de ácido graxo</i>	$n = 11$ 
Palmitato de isopropila (IPP) <i>Éster de ácido graxo</i>	$n = 13$ 
Ácido oléico <i>Ácido cis-9-octadecenóico</i>	
Triacetina <i>Triacetato de 1,2,3-propanotriol</i>	
Miglyol 812 <i>Triglicerídeos do ácido caprílico/cáprico</i>	$x = 6,8$ 

2.2.4.1.4 Fase aquosa em microemulsões biológicas

A fase aquosa utilizada em microemulsões para uso farmacêutico deve estar livre de contaminantes, sendo utilizado geralmente água bidestilada, deionizada ou ultra-pura, além de soluções de NaCl a 0,9%. Esta fase pode conter aditivos, como tampões (CORREA *et al.*, 2005), agentes gelificantes (VALENTA e SCHULTZ, 2004), promotores de permeação dérmica (LEE *et al.*, 2003; NEUBERT *et al.*, 2005) e diversos tipos de preservativos (PARK e KIM, 1999; KANG *et al.*, 2004; GAO *et al.*, 2003), que podem influenciar tanto na região de ocorrência de microemulsão quanto na solubilização do fármaco.

2.2.3 Caracterização físico-química

Em contraste com a fácil preparação, a caracterização das microestruturas presentes em um sistema microemulsionado nem sempre é um procedimento simples, apesar de esse ser um conhecimento de vital importância para a sua exploração comercial. Diversas técnicas têm sido largamente empregadas com o objetivo de caracterizar os sistemas microemulsionados. A nível macroscópico, experimentos de reologia (BOLZINGER-THEVENIN *et al.*, 1999; MORENO *et al.*, 2003; SPICLIN *et al.*, 2003; VALENTA e SCHULTZ, 2004) e de condutividade elétrica (PODLOGAR *et al.*, 2004; PODLOGAR *et al.*, 2005; LV *et al.*, 2005; ALANY *et al.*, 2001) têm sido empregados a fim de se obter valiosas informações a respeito das microestruturas presentes no interior dos sistemas microemulsionados.

Por sua vez, técnicas de espalhamento de luz (espalhamento de luz dinâmico – DLS, espalhamento de nêutrons a baixo ângulo – SANS, e espalhamento de raios X a baixo ângulo – SAXS) (MOULIK e PAUL, 1998; GODDEERIS *et al.*, 2006; SHUKLA *et al.*, 2003; SHUKLA e NEUBERT, 2006; BOON e YIP, 1982; SHUKLA *et al.*, 2002; FANUN *et al.*, 2001; TOMSIC *et al.*, 2006; GARTI *et al.*, 2006) e de microscopia (microscopia eletrônica de transmissão no modo criofratura – crio-TEM ou FFTEM) (MOULIK e PAUL, 1998; VINSON *et al.*, 1991; BOLZINGER *et al.*, 1998; ALANY *et al.*, 2001; BOLZINGER-THEVENIN *et al.*, 1999) podem ser utilizadas com o intuito de extrair informações sobre o tamanho das gotículas. Para as técnicas de espalhamento faz-se necessário a utilização de sistemas diluídos a fim de se evitar resultados incorretos devido às interações inter-gotas (PODLOGAR *et al.*, 2004). A utilização da microscopia eletrônica é restrita ao modo de criofratura. A visualização das microestruturas presentes no interior das microemulsões pela técnica de microscopia eletrônica requer o resfriamento extremamente rápido da amostra a fim de manter intacta a microestrutura e minimizar a ocorrência de artefatos (VINSON *et al.*, 1991).

Um dos principais atributos das microemulsões como veículos farmacêuticos é o seu alto poder de solubilização. A quantificação de um fármaco no interior de uma microemulsão pode ser feita a partir de técnicas cromatográficas, em especial a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) (RHEE *et al.*, 2001; LV *et al.*, 2005; CHEN *et al.*, 2004), ou espectroscópicas (espectroscopia no UV-Vis). Quando o fármaco microemulsionado absorve luz na região do UV-Visível ($760 > \lambda > 220$ nm) geralmente são utilizadas técnicas espectroscópicas para a quantificação do fármaco (MORENO *et al.*, 2001; HASSE e

KEIPERT, 1997; CORREA *et al.*, 2005), visto ser uma técnica mais simples e barata. Caso contrário, a quantificação pode ser feita apenas por CLAE. As interações do fármaco com os componentes da microemulsão e a sua localização exata no interior do sistema microemulsionado podem ser obtidas a partir de experimentos de ressonância magnética nuclear de ^1H (LV *et al.*, 2005) e de ressonância magnética nuclear de gradiente do campo pulsante (MOMOT e KUCHEL, 2003; JOHNSON JR., 1999; HUA *et al.*, 2004; FANUN *et al.*, 2001; KREILGAARD *et al.*, 2000; GARTI *et al.*, 2006).

A liberação e a permeação de fármacos a partir de microemulsões de uso tópico podem ser testadas *in vitro*, a partir de métodos de difusão de fluxo contínuo ou estático, combinado com o uso de membranas artificiais (acetato de celulose) (DALMORA *et al.*, 2001; JURKOVIC *et al.*, 2003) ou naturais (derme humana ou de porco) (CHEN *et al.*, 2004; SINTOV e BOTNER, 2006).

2.3 PRODUTOS NATURAIS E PROPRIEDADES FARMACOLÓGICAS

Plantas têm sido tradicionalmente utilizadas por populações em todos os continentes no controle de diversas doenças e pragas, sendo reconhecidas mais de 13 mil espécies que são mundialmente consumidas como fármacos ou fonte de fármacos (SIMÕES *et al.*, 2004). Cerca de 30% dos novos fármacos lançados no mercado nos últimos 30 anos foram obtidos a partir de fontes vegetais ou tiveram origem semi-sintética, isto é, a partir de transformações químicas de um produto natural (NEWMAN e CRAGG, 2007).

2.3.1 *Croton cajucara* Benth

O gênero *Croton*, de acordo com PAX e HOFFMANN (1931), pertence à família Euphorbiaceae (subfamília Crotonoideae), sendo um dos gêneros mais numerosos desta família (MACIEL *et al.*, 2006). A Euphorbiaceae possui mais de 8000 espécies amplamente distribuídas em regiões tropicais e temperadas de todo o mundo. No Brasil há mais de 300 das cerca de 700 espécies do gênero *Croton*, a maioria delas com propriedades químicas e/ou farmacológicas conhecidas. O gênero *Croton* tem representantes tanto medicinais, quanto

tóxicos; uma das espécies mais conhecidas no Norte do Brasil é o *Croton cajucara* Benth, vulgarmente conhecido por sacaca (feitiço na língua Tupi) (MACIEL *et al.*, 2000).

No estado do Pará, as folhas e cascas do caule deste *Croton cajucara* são utilizadas na forma de chá ou pílula, no combate a diabetes, diarreia, malária, febre, problemas estomacais, inflamação do fígado, rins, vesícula e no controle de índices elevados de colesterol. A sacaca também é comercializada em farmácias de manipulação e, neste caso, o pó das cascas do caule é vendido em cápsulas (quantidade aproximada de 250 mg). As folhas são comercializadas em feiras livres da cidade de Belém-PA para distúrbios do fígado e auxílio na digestão, principalmente após ingestão de alimentação rica em gorduras. O pó das folhas é vendido com indicação hepatoprotetora, para tratamento de diabetes e para dietas de emagrecimento (COSTA *et al.*, 2007).

Estudos fitoquímicos foram realizados com grandes quantidades de folhas e cascas do caule (partes utilizadas na medicina popular) de árvores variando entre 1½-6 anos de idade, buscando o isolamento de substâncias majoritárias que pudessem vir a ter representatividade em testes biológicos, e mostraram que as cascas do caule são ricas em diterpenos do tipo clerodano, tendo sido isolados: *trans*-desidrocrotonina (DCTN), *trans*-crotonina (CTN), *cis*-cajucarina B, *trans*-cajucarina B, cajucarina A, cajucarinolida, isocajucarinolida, isosacacarina e o triterpeno ácido acetilaleuritólico (AAA) (MACIEL *et al.*, 1998; MACIEL *et al.*, 2003).

2.3.1.1 *trans*-Desidrocrotonina

Dentre os terpenóides isolados, a DCTN (Figura 2.10) foi o componente majoritário isolado, com um rendimento incomum de 1,4%, em se tratando de produto natural. Este 19-*nor*-clerodano mostrou correlação com grande parte das propriedades farmacológicas de *Croton cajucara*, tendo sido comprovada as seguintes atividades: hipoglicêmica, hipolipidêmica, antigenotóxica, antiulcerogênica, antiinflamatória e antinociceptiva, antitumoral, antiestrogênica e cardiovascular (COSTA *et al.*, 2007).

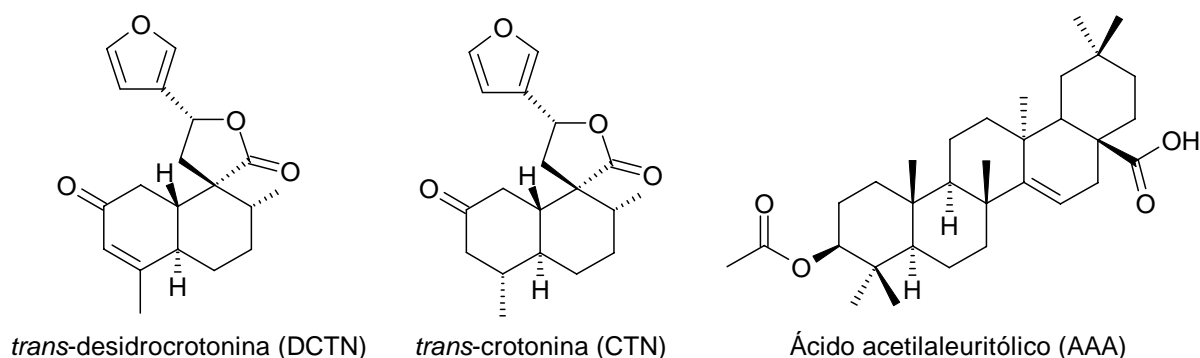


Figura 2.10 – Estrutura química da DCTN, CTN e AAA

2.3.1.2 Extratos da sacaca

Extratos de várias polaridades obtidos das folhas de *Croton cajucara* apresentaram atividade anti-hiperlipidêmica (FARIAS *et al.*, 1996), antiinflamatória e antinociceptiva (CAMPOS *et al.*, 2002). No entanto, apesar do seu perfil farmacológico, esses extratos apresentaram baixa solubilidade nos solventes biológicos convencionais, dificultando sua biodisponibilização (GOMES *et al.*, 2007).

Além dos clerodanos, observou-se a presença de flavonóides (3,7,4'-tri-*O*-metilcanferol e 3,7-di-*O*-metilcanferol) e esteróides (β -sitosterol, estigmasterol, 3-*O*-glicopiranosil- β -sitosterol) em extratos polares de *Croton cajucara* (MACIEL *et al.*, 2009). Estes compostos, em especial os flavonóides, foram correlacionados com a propriedade antioxidante deste *Croton* (MACIEL *et al.*, 2009).

Estudos realizados com o extrato hexânico comprovaram que o óleo fixo apolar obtido das cascas do caule de *Croton cajucara* possui propriedades antinociceptiva e antiinflamatória (BIGHETTI *et al.*, 1999), bem como atividade antifúngica frente a diversos patógenos (SOUZA *et al.*, 2006). Esta atividade biológica pode estar correlacionada à presença de sesquiterpenos (espatulenol, 24%; α -copaeno, 20%; cipreno, 21%; linalol, 0,6%) e diterpenos do tipo clerodano (*trans*-crotonina, *cis*-cajucarina B e *trans*-cajucarina B) presentes neste óleo essencial (SOUZA *et al.*, 2006).

2.3.2 *Phyllanthus amarus* Schum. & Thonn

Phyllanthus amarus Schum. & Tonn (Euphorbiaceae) é um arbusto que cresce de 30 a 60 cm, pertencente à família Euphorbiaceae, e pode ser encontrado em áreas tropicais e subtropicais da América, Ásia e África (WRIGHT *et al.*, 2007). No Brasil, esta espécie também é conhecida como “quebra-pedra”, sendo empregada na medicina popular para o tratamento de diversos distúrbios, tais como: disfunções renais, infecções intestinais, diabetes e hepatite B (WRIGHT *et al.*, 2007; KUMARAN e KARUNAKARAN, 2007; CALIXTO *et al.*, 1998), além de possuir propriedades anticâncer e antiinflamatória, frente a doenças que tem como etiologia a ação de radicais livres (KUMARAN e KARUNAKARAN, 2007).

O estresse oxidativo, induzido pelo oxigênio radicalar, é considerado como uma das principais causas de diversas doenças degenerativas como câncer, arteriosclerose, úlcera gástrica, dentre outros (KUMARAN e KARUNAKARAN, 2007). Diversos produtos naturais, como os polifenóis, taninos e flavonóides presentes em plantas do gênero *Phyllanthus* (HARISH e SHIVANANDAPPA, 2006; FANG *et al.*, 2008), apresentam atividade antioxidante por serem capazes de doar um átomo de hidrogênio ou um elétron ao radical livre.

2.3.3 *Anacardium occidentale* L.

A espécie *Anacardium occidentale* L. (Anacardiaceae), popularmente conhecida como caju, é nativa das regiões norte e nordeste do Brasil. A Amazônia parece ter sido o berço de diferentes espécies do gênero *Anacardium* que se irradiou para o resto do mundo. E o cajueiro, seu representante mais conhecido, é uma árvore rústica, nativa da zona arenosa litorânea de campos e dunas, que vai do nordeste do país até o baixo Amazonas (SILVA e TASSARA, 1996). Os indígenas de língua tupi, habitantes autóctones do nordeste do Brasil, já conheciam muito bem o caju e faziam dele um de seus mais completos e importantes alimentos (SILVA e TASSARA, 1996).

Muitos são os usos etnofarmacológicos associados ao caju, dentre eles encontram-se: adstringente, antidiabético, anti-diarréico, anti-hemorragico, antiinflamatório, anti-reumático, antitérmico, antiulcerogênico, diurético e vermífugo, onde são utilizados cascas do caule,

casca da castanha, ramos, pendúculos, raiz, folhas, frutos, semente e óleo (GONÇALVES *et al.*, 2005). Metabólitos especiais (ácidos anacárdicos, cardanóis, cardóis e fenóis alquílicos) extraídos do líquido da castanha de caju de *Anacardium occidentale* apresentaram atividade antioxidante (TREVISAN *et al.*, 2006). Diversos metabólitos presentes nas plantas têm apresentado atividade antioxidante, sendo cada vez mais reconhecidos como importantes agentes na captura de radicais livres (cuja formação ocorre espontaneamente em diferentes etapas do metabolismo, em que processos oxidativos estão envolvidos) que estão diretamente relacionados ao processo de envelhecimento e às doenças degenerativas, dentre elas o câncer.

2.4 SIMULAÇÕES POR DINÂMICA MOLECULAR

Simulações computacionais são frequentemente utilizadas em diversos estudos com o objetivo de compreender as propriedades de moléculas e agregados moleculares em termos estruturais e interações microscópicas entre elas. Elas servem como um complemento aos experimentos convencionais, permitindo compreender algo novo que dificilmente seria descoberto utilizando os métodos convencionais atuais. São duas as principais técnicas de simulação computacional clássica: Dinâmica Molecular (MD) e Monte Carlo (MC). Adicionalmente, existem várias técnicas híbridas que combinam características de ambas. As técnicas de simulação computacional podem ainda atuar como ponte entre a dimensão e a escala de tempo microscópicas e o mundo macroscópico dos experimentos laboratoriais. Pode-se assim prever interações moleculares e obter previsões “exatas” acerca das propriedades de uma solução, por exemplo. Por fim, os métodos computacionais podem também realizar simulações que seriam difíceis ou impraticáveis em laboratório, como os experimentos que devem ser realizados a altíssima pressão e/ou temperatura.

A simulação por Dinâmica Molecular (MD, do inglês *Molecular Dynamics*) constitui em uma das principais ferramentas computacionais para o estudo de sistemas atômico-moleculares, para os quais os efeitos de temperatura não podem ser desconsiderados. Nesta categoria estão incluídos os sistemas físicos, químicos e biológicos constituídos por um grande conjunto de átomos ou moléculas (aproximadamente 10^{23} partículas), cujas propriedades são governadas por processos que envolvem energias da ordem de $k_B T$, onde k_B é a constante de Boltzmann e T é a temperatura em Kelvin.

Em termos simplificados, a Dinâmica Molecular é uma técnica computacional em que se determinam os movimentos das partículas de qualquer sistema, do qual se conhecem o potencial de interação entre estas partículas e as equações que regem seu movimento. A Dinâmica Molecular permite, portanto, estudar a evolução temporal das configurações dos constituintes do sistema e, a partir das sequências de posições geradas, determinar as propriedades macroscópicas do sistema, conforme os princípios fundamentais da Mecânica Estatística. Neste método, partículas interagentes, inicialmente dispostas em uma determinada configuração, movimentam-se sob a influência de potenciais intermoleculares. Conhecendo posições e velocidades de todas as partículas em um determinado instante t_0 , pode-se computar as forças resultantes em cada partícula, devido às interações com as demais e então determinar posições e velocidades em um instante superior $t_0 + \delta t$, através das equações de movimento Newtonianas. As novas posições são utilizadas para o cálculo de novas forças e daí posições e velocidades em $t_0 + 2 \cdot \delta t$. Este procedimento é realizado sucessivamente gerando trajetórias moleculares para todo o sistema.

O número de partículas que compõem o sistema a ser simulado depende da natureza do próprio sistema, das propriedades que se deseja estudar e da capacidade computacional disponível, mas deve, sobretudo, ser representativo do sistema macroscópico real. Sistemas contendo 10^3 – 10^6 átomos podem ser estudados com os métodos e recursos computacionais atuais (MORGON e COUTINHO, 2007). As propriedades de equilíbrio do sistema em estudo são determinadas a partir de médias temporais sobre um intervalo de tempo suficientemente grande na escala atômica (aproximadamente entre 10^{-11} a 10^{-8} segundo de tempo real). O tempo total de simulação depende dos processos dinâmicos que se deseja investigar e da convergência estatística das propriedades de interesse.

Uma característica marcante do método MD é o estabelecimento de forte sinergia com estudos experimentais. Os resultados das investigações experimentais geralmente motivam e guiam os estudos de MD. Os resultados obtidos por dinâmica, por sua vez, fornecem explicações detalhadas a nível microscópico dos fenômenos observados experimentalmente. Outra característica importante é a diversidade de sistemas tratáveis por esta metodologia. Podem ser estudados por MD desde sistemas homogêneos como gases, fluidos supercríticos, líquidos, soluções e misturas, a sistemas pouco (ou nada) homogêneos como interfaces, filmes de Langmuir-Blodgett, biomembranas, polímeros orgânicos e inorgânicos, polissacarídeos, lipídeos, proteínas, ácidos nucleicos e seus complexos, passando por sistemas como micelas, zeólitas, argilas e nanomateriais (MORGON e COUTINHO, 2007).

2.4.1 Interações moleculares

A técnica de simulação por Dinâmica Molecular consiste basicamente na resolução, passo a passo, das equações de movimento, que para um sistema atômico simples pode ser escrita como:

$$m_i \cdot \ddot{r}_i = f_i \quad f_i = -\frac{\partial}{\partial r_i} E(r^N) \quad (4)$$

As forças F , atuando sobre os átomos, podem ser calculadas derivando a energia potencial $E(r^N)$, onde $r^N = (r_1, r_2, \dots, r_N)$ representa o conjunto completo de $6N$ coordenadas atômicas, em que N é o número de átomos do sistema.

O estado de um sistema clássico pode ser completamente descrito especificando as posições e momento lineares de todas as partículas. O espaço sendo tridimensional, cada partícula está associada a 6 coordenadas. Um sistema de N partículas é caracterizado por $6N$ coordenadas. O espaço dimensional $6N$, definido por estas coordenadas é chamado de espaço-fase do sistema.

As simulações MD clássicas são, na maioria das vezes, aplicadas a sistemas onde se consideram interações clássicas. Com o objetivo de viabilizar o cálculo, os métodos MD negligenciam os efeitos quânticos, gerando um erro intrínseco associado a essa aproximação. Para esta finalidade, o sistema em estudo deve estar em estados nos quais os efeitos quânticos possam ser desprezados, ou seja, estados nos quais as energias e as massas consideradas são muito maiores que as envolvidas em efeitos nos quais as energias são transferidas em quantidades discretas e não contínuas. Os potenciais efetivos clássicos de interações moleculares (campos de força) são normalmente derivados de cálculos quânticos e posteriormente ajustados através de métodos empíricos bem controlados de maneira a representarem adequadamente as interações entre os constituintes em uma dada faixa de condições termodinâmicas.

Os potenciais utilizados nas simulações MD clássicas são aproximações ou representações clássicas de potenciais quânticos. Isto é, nenhum efeito quântico é considerado. Isto quer dizer que nas simulações MD clássicas, nenhuma ligação química é rompida, não há interações entre orbitais e não há ressonância, por exemplo. Diversos tipos de potenciais analíticos podem ser usados para representar as interações entre as partículas, que devem ser escolhidos para cada tipo de interação, procurando a melhor representação da curva de energia potencial verdadeira, de acordo com os recursos computacionais disponíveis e com

o tipo de fenômeno observado. Estes potenciais analíticos poderiam ser usados para propagar a trajetória dos núcleos tanto quanticamente, de acordo com a equação de Schrödinger dependente do tempo, como classicamente, pelas equações de Newton. O cálculo das trajetórias usando a mecânica clássica é, evidentemente, muito mais rápido, pois a interação entre as partículas é analisada apenas pela carga atômica, enquanto que nos métodos MD quanto-mecânicos a interação entre as partículas é analisada eletronicamente. Para o estudo de propriedades dinâmicas de biomoléculas e certos agregados moleculares, à temperatura ambiente, utilizando o método MD clássico existe um erro intrínseco, mas que pode ser pouco relevante dependendo da análise feita (MORGON e COUTINHO, 2007).

2.4.2 Campos de força e parametrização

No contexto da mecânica molecular, um campo de força consiste em um conjunto de funcionais e parâmetros utilizados para descrever a energia potencial de um conjunto de partículas e que são derivados de trabalhos experimentais e de cálculos quânticos. Um campo de força pode fornecer parâmetros para cada átomo em um sistema (*all-atom force field*), incluindo o hidrogênio, ou tratar átomos de carbono e hidrogênio, em grupos metil ou metilênicos por exemplo, como um único centro de interação (*united-atom force field* ou *coarse-grained force field*). Este último tipo de campo de força é frequentemente utilizado em longas simulações envolvendo proteínas e outras macromoléculas, em que se pode aumentar a eficiência computacional simplificando o sistema estudado com apenas poucas perdas de informações.

Os funcionais de um campo de força englobam tanto os termos ligados, referentes aos átomos que estão ligados por ligações covalentes, quanto os termos não-ligados que descrevem as interações eletrostáticas e de van der Waals de longo alcance. A decomposição específica destes termos depende do campo de força, mas uma forma geral da energia potencial total (E_{total}) calculada por um campo de força genérico pode ser descrito como:

$$E_{total} = E_{ligados} + E_{não-ligados} , \quad (5)$$

onde a energia dos componentes ligados e não ligados podem ser dados pelas equações:

$$E_{ligados} = E_{ligação} + E_{angular} + E_{torsional} , \quad (6)$$

$$E_{não-ligados} = E_{eletrostática} + E_{Lennard-Jones} \quad (7)$$

Os termos $E_{\text{ligação}}$ e E_{angular} correspondem, respectivamente, aos estiramentos de uma ligação química e às descrições das deformações angulares, e são geralmente modelados como osciladores harmônicos, não permitindo a quebra da ligação. O termo $E_{\text{torsional}}$ corresponde às deformações dos ângulos diedro. O termo não ligado $E_{\text{Lennard-Jones}}$ refere-se às interações intermoleculares de van der Waals computadas em termos do potencial de Lennard-Jones, enquanto que o termo eletrostático $E_{\text{eletrostática}}$ obedece a lei de Coulomb.

Além dos funcionais, um campo de força deve definir um conjunto de parâmetros para cada tipo de átomo. Como exemplo, um campo de força deve incluir parâmetros distintos para átomos de oxigênio de um grupo carbonila e de um grupo hidroxila. Um conjunto de parâmetros típico inclui valores para a massa atômica, raio de van der Waals e carga parcial para cada átomo individualmente, e valores de equilíbrio para comprimento de ligação, ângulos de ligação e diedros. Geralmente, os parâmetros não são transferíveis entre campos de força devido à utilização de diferentes funcionais de interação, e devido à existência de correlações entre os parâmetros em cada campo de força. Pelo fato de usarem moléculas e protocolos diferentes em suas parametrizações, pode acontecer de dois campos de força possuírem parâmetros diferentes e serem igualmente precisos na descrição de determinadas propriedades de um mesmo sistema.

Atualmente, existem diversos tipos de campos de força, cada qual projetado para diferentes finalidades. Dentre eles, os mais usados são o AMBER (CASE *et al.*, 2006), CHARMM (MACKERELL JR. *et al.*, 1998), GROMACS (LINDAHL *et al.*, 2001) e OPLS (JORGENSEN *et al.*, 1996).

2.4.3 Etapas da simulação MD

Para a simulação de partículas através do método de Dinâmica Molecular são necessárias algumas técnicas específicas para cada etapa do processo de descrição das posições e velocidade das partículas a cada instante. Geralmente, estas etapas incluem: (i) a geração inicial das moléculas; (ii) o cálculo das forças exercidas sobre cada partícula, devido às interações intermoleculares; (iii) a movimentação das partículas; (iv) a escolha de ensembles e controles de simulação; e (v) a análise ou armazenamento das configurações (trajetórias) (MORGON e COUTINHO, 2007).

Inicialmente é criada uma caixa de simulação, que pode adotar a configuração cúbica, ortorrômbica, octaédrica ou outra geometria, onde se encerram as N moléculas do sistema. As dimensões desta caixa são escolhidas de modo que a densidade numérica, N/V , corresponda àquela do sistema real nas condições termodinâmicas estudadas. A posição inicial das moléculas na caixa de simulação pode ser feita de forma aleatória ou em configurações específicas. No entanto, para evitar que eventuais maus-contatos entre moléculas prejudiquem os primeiros passos de uma simulação, a maioria dos programas de simulação MD requerem uma acomodação das moléculas na caixa de simulação, que é realizada através de uma etapa de minimização da energia de interação entre as moléculas (MORGON e COUTINHO, 2007).

Apesar de atualmente dispormos de recursos computacionais para estudarmos sistemas com até cerca de 10^6 partículas, o método MD pode usar condições de fronteira para que os resultados obtidos possam ser extrapolados para um sistema real de partículas (aproximadamente 10^{23} partículas). Assim, impõem-se condições periódicas de contorno à caixa MD, imaginando que ela está rodeada por imagens dela própria, preenchendo todo o espaço tridimensional. As partículas-imagem em cada caixa-imagem terão precisamente as mesmas posições relativas e as mesmas velocidades do que as partículas na caixa MD, como ilustrado na Figura 2.11.

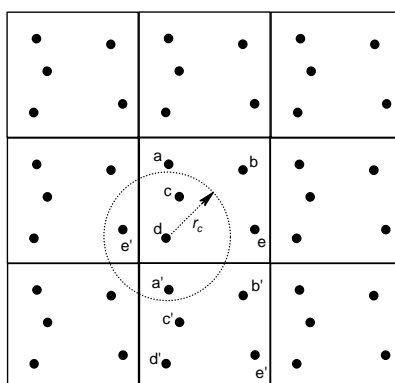


Figura 2.11 – Exemplo de uma caixa MD, a sua transição e condições de fronteira a duas dimensões

Uma dada partícula, em princípio, deve interagir com todas as demais partículas do sistema, bem como suas imagens e mesmo com as imagens dela própria, com exceção dela mesma. Isto tornaria o cálculo extremamente oneroso. Na prática, a caixa de simulação é gerada grande o bastante para que cada átomo só interaja com as imagens mais próximas. Quando as interações entre as moléculas forem de curto alcance, isto é, quando puderem ser desprezadas após uma distância pré-determinada (aproximadamente 3 diâmetros

moleculares), chamada de distância ou raio de corte ou truncamento, r_c , os cálculos das forças e energia são realizados de acordo com a aproximação da imagem mais próxima com truncamento: dada uma partícula d , a caixa sofre uma translação de modo a ficar centrada em d (Figura 2.11). Então a partícula d somente atua explicitamente com as partículas ou imagens que se encontrem dentro do raio de corte, r_c , centrado na partícula d . A distância r_c deve ser igual ou menor do que metade do lado da caixa MD. Após a distância r_c , assume-se uma distribuição uniforme de partículas e aplicam-se correções de longo alcance que podem ser calculadas analiticamente.

A densidade do sistema é mantida, assumindo que se uma partícula sair da caixa MD atravessando uma das paredes, uma das partículas-imagem entra pela parede oposta com a mesma velocidade. Deste modo, o método de Dinâmica Molecular mantém o volume V e o número de moléculas constantes. Por outro lado, uma vez que as posições e velocidades iniciais estejam atribuídas, a energia total do sistema fica definida como o somatório das energias cinética e potencial para cada partícula. Como o sistema evolui no tempo sem interferências externas, então a energia total conserva-se ao longo da trajetória no espaço físico. De acordo com a Mecânica Estatística, a média temporal de qualquer propriedade sobre aquela trajetória deve ser equivalente à média de ensemble microcanônico. Ou seja, as médias de ensemble microcanônico podem ser obtidas a partir de uma trajetória de Dinâmica Molecular. Como a energia total, volume e número de moléculas se mantêm constantes, propriedades como a temperatura e a pressão, por exemplo, flutuam ao longo da trajetória. O sistema alcançará o equilíbrio quando as médias das propriedades flutuantes forem constantes no tempo.

2.4.3.1 Ensembles

Durante a simulação, alguns parâmetros macroscópicos podem ser mantidos constantes em conjuntos como NpT , NVT ou NVE , onde N é o número de partículas no sistema, p a pressão, V o volume, T a temperatura e E a energia. Estes conjuntos de parâmetros caracterizam ensembles (conjuntos) diferentes e definem uma equação de estado para o sistema, de modo a permitir que diferentes funções termodinâmicas possam ser mais convenientemente calculadas em um ou outro ensemble. Um ensemble é um grande conjunto de réplicas de um sistema de interesse que diferem entre si nas atribuições das coordenadas e

do momento das partículas. Assim, cada réplica ocupa uma região do espaço de fases. Se o sistema for ergódico (isto é, depois de um tempo suficientemente grande cada réplica do sistema tiver passado por todas as regiões do espaço de fases, onde a densidade de probabilidade não é nula), a média temporal, da qual as funções termodinâmicas são definidas, pode ser mais convenientemente, segundo Gibbs, substituídas por médias de ensemble (MORGON e COUTINHO, 2007).

Equações de movimento diferentes geram sucessões de estados de acordo com o ensemble empregado. As equações de movimento de Newton, especificamente, geram estados com energias constantes e, se o sistema em estudo estiver livre de qualquer campo externo, podem ser aplicadas as equações de Newton de maneira muito simples, para a obtenção das trajetórias determinadas por estados do ensemble microcanônico (*NVE*). Na prática, uma dada propriedade termodinâmica será obtida computando-se médias sobre todas as configurações do sistema definidas pelas trajetórias de MD.

Estado da Arte

3 ESTADO DA ARTE

Neste capítulo é apresentado um breve resumo dos estudos encontrados na literatura a respeito de sistemas microemulsionados aplicados à veiculação de fármacos (seção 3.1), das propriedades biológicas dos produtos e extratos vegetais utilizados neste trabalho (seção 3.2) e de estudos de simulação por Dinâmica Molecular realizadas com micelas formadas por tensoativos à base de açúcares (seção 3.3).

3.1 MICROEMULSÕES COMO VEÍCULOS DE FÁRMACOS

Na farmacologia, as microemulsões têm sido bastante utilizadas na preparação de nanopartículas poliméricas (LÓPEZ-QUINTELA, 2003), bem como em sistemas de liberação de fármacos nas mais diversas vias de administração. Um exemplo significativo é a formulação comercial de uso oral Sandimmune Neoral®, em que o fármaco ciclosporina A, um undecapeptídeo cíclico imunossupressante, utilizado no combate à rejeição de órgãos de pacientes transplantados, foi incorporado em uma microemulsão pré-concentrada contendo Labrafil, azeite de oliva, etanol e outros excipientes (STRICKLEY, 2004).

Em um contexto geral, fármacos de diversas classes têm sido incorporados em sistemas microemulsionados para as diversas vias de administração, objetivando variadas aplicações farmacológicas, tais como: aumentar a biodisponibilidade do fármaco, reduzir sua toxicidade e/ou manter sua concentração plasmática constante. A aplicação pela via oral de microemulsões, por exemplo, é bastante comum para agentes antitumorais (KANG *et al.*, 2004; YANG *et al.*, 2004) devido à grande capacidade de solubilização desses sistemas. Para os antibióticos, a incorporação em microemulsões para uso parenteral é preferencial (HU *et al.*, 2001; MORENO *et al.*, 2001; BRIME *et al.*, 2004), no sentido de se manter a sua concentração plasmática constante e diminuir seus efeitos adversos. Por fim, microemulsões de uso transdérmico têm sido amplamente utilizadas para a veiculação de agentes antiinflamatórios (ESCRIBANO *et al.*, 2003; DALMORA *et al.*, 2001; MEI *et al.*, 2003) e anestésicos (KREILGAARD *et al.*, 2001; AREVALO *et al.*, 2004). No primeiro caso, as microemulsões de uso tópico podem evitar o surgimento de efeitos adversos gastrintestinais, e

no segundo, podem aumentar a absorção dos agentes anestésicos, produzindo um efeito mais imediato.

3.1.1 Administração oral de microemulsões

A via oral é a rota preferencial para a veiculação da maioria dos agentes terapêuticos, já que evita a dor e o risco de infecção associados à via parenteral, além de apresentar maior aceitação por parte do paciente. No entanto, a veiculação oral de fármacos lipofílicos é prejudicada devido à baixa solubilidade em água desses agentes, o que acarreta em uma biodisponibilidade oral bastante reduzida. A via oral também representa um grande obstáculo para os fármacos peptídicos devido a certas barreiras enzimáticas e físicas do trato gastrointestinal (SARCIAUX *et al.*, 1995).

A biodisponibilidade está relacionada com a quantidade de fármaco que alcança a circulação sistêmica em comparação com a dose administrada, sendo clinicamente importante porque os efeitos farmacológicos e toxicológicos de um fármaco são proporcionais tanto à dose quanto à própria biodisponibilidade. Quando a biodisponibilidade é muito baixa, como no caso da maioria dos peptídeos, a sua variação se torna mais abrangente, ocasionando dificuldades no controle da concentração do fármaco e dos efeitos produzidos por ele. Além disso, se a biodisponibilidade oral de um fármaco é de cerca de 10%, significa que 90% da dose administrada é perdida. Para fármacos de elevado custo, esta situação pode ser inaceitável.

A Organização Mundial de Saúde (OMS) divide os fármacos de uso oral em quatro classes: cerca de 34% dos fármacos comerciais pertencem à classe I (alta solubilidade aquosa; alta permeabilidade pelo trato gastrointestinal), 17% à classe II (baixa solubilidade; alta permeabilidade), 39% à classe III (alta solubilidade; baixa permeabilidade), e 10% à classe IV (baixa solubilidade; baixa permeabilidade) (LINDENBERG *et al.*, 2004). Regra geral, os sistemas microemulsionados são mais empregados na veiculação oral de fármacos lipofílicos (classes II e IV). Isso porque fármacos lipofílicos necessitam atravessar o meio aquoso antes de alcançar os tecidos-alvos, e esta etapa geralmente é a responsável pela sua baixa biodisponibilidade devido à sua pouca solubilidade em água. Dessa forma, sistemas microemulsionados permitem que tais fármacos estejam distribuídos no interior das três fases

(fase dispersa, fase contínua ou dispersante, e camada interfacial de tensoativo), minimizando a sua precipitação e garantindo, assim, o aumento da sua biodisponibilidade.

Vários métodos foram desenvolvidos na tentativa de otimizar a biodisponibilização oral de determinados fármacos, dentre eles o uso de sistemas de liberação controlada de fármacos. Nesse contexto, as microemulsões se apresentam como bons veículos de liberação oral, pois apresentam ampla capacidade de solubilização de fármacos pouco solúveis em água (YANG *et al.*, 2004) ou ainda, evitando a sua degradação enzimática (LYONS *et al.*, 2000). Entretanto, uma microemulsão pode ser diluída em contato com um meio fisiológico, podendo resultar na formação de outras microestruturas a partir da quebra da microemulsão. De fato, a diluição de uma microemulsão acarreta em um aumento do volume de água na sua composição, e microemulsões do tipo A/O podem ser invertidas, transformando-se em microemulsões múltiplas ou do tipo O/A. Além disso, a diluição de uma microemulsão pode provocar ainda sua desestabilização devido à migração de moléculas do cotensoativo do filme interfacial para a fase aquosa externa.

Com o intuito de minimizar estas desvantagens foram desenvolvidos sistemas de liberação de fármacos auto-microemulsificantes (*Self-microemulsifying drug delivery systems* – SMEDDS). Esses sistemas são constituídos de uma mistura isotrópica de tensoativos(s), cotensoativo, óleo e o fármaco, que pode ser dispersa no trato gastrintestinal gerando, após leve agitação, microemulsões do tipo O/A com tamanho inferior a 100 nm (POUTON, 1997). Geralmente, a própria mobilidade digestiva do estômago e do intestino já gera uma agitação suficiente para auto-microemulsificação *in vivo*. Os SMEDDS são compostos principalmente por óleos e/ou tensoativos de natureza lipídica (GERSHANIK e BENITA, 2000; HU *et al.*, 2001), já que as microemulsões com componentes lipídicos apresentam a capacidade de aumentar a liberação do fármaco (KIM *et al.*, 2000) e de minimizarem possíveis variações na sua absorção (SUBRAMANIAN *et al.*, 2004), uma vez que este tipo de tensoativo é facilmente hidrolisado no intestino delgado por enzimas do pâncreas (ARAYA *et al.*, 2006). A utilização dos sistemas auto-microemulsificantes tem recebido bastante atenção (Tabela 3.1) após o sucesso comercial de formulações contendo a ciclosporina A (comercializada com o nome de Sandimmune Neoral®), e dois inibidores da protease do HIV, o saquinavir (Fortovase®) e o ritonavir (Norvir®) (STRICKLEY, 2004).

Tabela 3.1 – Fármacos microemulsionados para administração oral

Fármaco	Estudos	Referência
Flurbiprofeno	Caracterização físico-química	(LI <i>et al.</i> , 2005)
Ibuprofeno	Farmacocinético	(ARAYA <i>et al.</i> , 2006)
Celecoxibe	Farmacocinético	(SUBRAMANIAN <i>et al.</i> , 2004)
	Caracterização físico-química	(GARTI <i>et al.</i> , 2006)
Paclitaxel	Citotóxico (MCF7) Antitumoral <i>in vivo</i> (SKOV-3)	(KANG <i>et al.</i> , 2004)
	Farmacocinético	(YANG <i>et al.</i> , 2004)
	Citotóxico (HTB37)	(GURSOY <i>et al.</i> , 2003)
	Caracterização físico-química	(LEE <i>et al.</i> , 2008)
Halofantrina	Farmacocinético	(KHOO <i>et al.</i> , 1998)
	Farmacocinético	(HOLM <i>et al.</i> , 2003)
Nitrendipina	Farmacocinético	(KAWAKAMI <i>et al.</i> , 2002)
Bifenil dimetil dicarboxilato (BDD)	Farmacocinético	(KIM <i>et al.</i> , 2001)
Danazol	Farmacocinético	(PORTER <i>et al.</i> , 2004)
Idebenona	Caracterização físico-química	(KIM <i>et al.</i> , 2000)
Simvastatina	Farmacocinético	(KANG <i>et al.</i> , 2004)
Silimarina	Farmacocinético	(WU <i>et al.</i> , 2006)
	Farmacocinético	(WOO <i>et al.</i> , 2007)
Seocalcitol	Farmacocinético	(GROVE <i>et al.</i> , 2006)
	Farmacocinético	(GROVE <i>et al.</i> , 2007)
Leuprolida	Supressão gonadotrópica <i>in vivo</i> Farmacocinético	(ZHENG e FULU, 2006)

Xibornol	Toxicológico	(CIRRI <i>et al.</i> , 2007)
Fenofibrato	Antilipidêmico <i>in vivo</i>	(PATEL e VAVIA, 2007)
Itraconazol	Farmacocinético	(WOO <i>et al.</i> , 2008)
Vinpocetina	Farmacocinético	(CHEN <i>et al.</i> , 2008)
Docetaxel	Farmacocinético	(YIN <i>et al.</i> , 2009)
Arteméter	Antimalárico <i>in vivo</i>	(MANDAWGADE <i>et al.</i> , 2008)
Oridonina	Farmacocinético	(ZHANG <i>et al.</i> , 2008)
	Caracterização físico-química	(LIU <i>et al.</i> , 2009)
9-nitro-camptotecina	Farmacocinético Citotóxico Antitumoral <i>in vivo</i> (SKOV-3)	(LU <i>et al.</i> , 2008)
Exemestano	Caracterização físico-química	(SINGH <i>et al.</i> , 2008)
Curcumina	Farmacocinético	(CUI <i>et al.</i> , 2009)
Nimodipina	Farmacocinético	(YI <i>et al.</i> , 2008)
Tacrolimo	Caracterização físico-química	(BORHADE <i>et al.</i> , 2008)
Prostaglandina E1	Disfunção erétil <i>in vivo</i>	(LEE <i>et al.</i> , 2008)
<i>N</i> -acetilglicosaminil- <i>N</i> -acetilmuaramil dipeptídeo	Farmacocinético	(LYONS <i>et al.</i> , 2000)
Derivados da heparina	Farmacocinético	(KIM <i>et al.</i> , 2005)

3.1.2 Administração parenteral de microemulsões

A via parenteral é bastante utilizada quando se deseja um efeito farmacológico imediato, já que o fármaco é administrado diretamente na corrente sanguínea, estando ele completamente biodisponível. No entanto, a administração parenteral de fármacos lipofílicos, especialmente pela via intravenosa, é um grave problema para a indústria farmacêutica, visto

que soluções oleosas e agregados relativamente grandes podem causar embolia (VON CORSWANT *et al.*, 1998; PARK *et al.*, 1999).

As microemulsões do tipo O/A são capazes de solubilizar fármacos pouco solúveis no interior hidrofóbico de microestruturas cujo meio dispersante é a água, e dessa forma, têm sido estudadas como sistemas capazes de administrar parenteralmente fármacos lipofílicos (Tabela 3.2), principalmente aqueles que apresentam baixa biodisponibilidade oral (VON CORSWANT *et al.*, 1998; PARK e KIM, 1999; HWANG *et al.*, 2004). Mais do que em qualquer outra aplicação, o uso de microemulsões para a liberação parenteral de fármacos requer alguns cuidados com relação à toxicidade dos componentes (MORENO *et al.*, 2003; VON CORSWANT *et al.*, 1998), ao controle do tamanho das gotículas (a fim de se evitar a percolação) (PARK *et al.*, 1999) e à esterilização da formulação. Com relação a este último, apesar das microemulsões não poderem ser autoclavadas, elas podem ser facilmente esterilizadas por filtração (JUNPING *et al.*, 2003).

Tabela 3.2 – Fármacos microemulsionados para administração parenteral

Fármaco	Estudos	Referência
Gentamicina	Farmacocinético	(HU <i>et al.</i> , 2001)
Anfotericina B	Caracterização físico-química Toxicológico	(MORENO <i>et al.</i> , 2001)
	Antifúngico <i>in vivo</i>	(BRIME <i>et al.</i> , 2004)
	Farmacocinético	(BRIME <i>et al.</i> , 2003)
	Caracterização físico-química Toxicológico	(BRIME <i>et al.</i> , 2002)
Flurbiprofeno	Farmacocinético	(PARK e KIM, 1999)
	Farmacocinético	(PARK <i>et al.</i> , 1999)
Paclitaxel	Farmacocinético Citotóxico (H292) Antitumoral <i>in vivo</i> (B16) Toxicológico	(RODRIGUES <i>et al.</i> , 2005)
	Farmacocinético Hipersensibilidade	(HE <i>et al.</i> , 2003)

Vincristina	Farmacocinético Antitumoral <i>in vivo</i> (M5076) Toxicológico	(JUNPING <i>et al.</i> , 2003)
Etoposida	Farmacocinético	(AZEVEDO <i>et al.</i> , 2005)
Ácido retinóico	Farmacocinético Citotóxico (HL60 e MCF7)	(HWANG <i>et al.</i> , 2004)
Norcantaridina	Farmacocinético	(ZHANG <i>et al.</i> , 2005)
Felodipina	Caracterização físico-química Toxicológico	(VON CORSWANT <i>et al.</i> , 1998)

3.1.3 Administração transdérmica de microemulsões

A via transdérmica oferece várias vantagens quando comparada com outras vias de administração mais tradicionais. A administração transdérmica de um fármaco permite, por exemplo, que ele alcance a circulação sistêmica sem sofrer o efeito de primeira passagem no fígado, o que é muito útil para fármacos que apresentam intenso metabolismo hepático. Além disso, a via transdérmica permite uma liberação mais gradual e controlada do fármaco, evitando o surgimento de picos plasmáticos que podem estar associados a efeitos adversos. Outras vantagens incluem a fácil administração de uma formulação transdérmica e a possibilidade da imediata suspensão do tratamento, quando necessário (KREILGAARD, 2002; HEUSCHKEL *et al.*, 2008).

No entanto, apesar das vantagens da administração transdérmica, poucos fármacos estão disponíveis comercialmente como formulações tópicas. A principal limitação se encontra na própria pele, e mais especificadamente na *stratum corneum*, que é considerada como um dos mais impermeáveis epitélios do corpo humano para substâncias exógenas. Dessa forma, o principal desafio das formulações tópicas atualmente é permitir um aumento substancial da permeação dérmica do fármaco sem induzir alterações irreversíveis na permeabilidade da pele (KREILGAARD, 2002).

As microemulsões têm sido bastante estudadas como formulações tópicas tanto para moléculas hidrofílicas quanto lipofílicas, das mais variadas classes de fármacos (Tabela 3.3).

De fato, determinadas características das microemulsões contribuem para uma eficiente administração transdérmica. A primeira delas é a grande quantidade de fármaco que pode ser incorporada na formulação devido à sua alta capacidade de solubilização, aumentando assim, o gradiente de concentração frente à pele (HUA *et al.*, 2004). Outro aspecto é o controle do coeficiente de partição do fármaco no interior da microemulsão e entre a microemulsão e a pele, que pode ser regulado mudando-se a composição e/ou os constituintes da microemulsão (CHANGEZ *et al.*, 2006). Por fim, os tensoativos, em especial as lecitinas, e certos óleos, principalmente os ácidos graxos, como o ácido oléico, e seus ésteres como o miristato de isopropila, utilizados como componentes de microemulsões, podem reduzir a barreira funcional da *stratum corneum* e atuar como promotores de permeação dérmica (CHANGEZ *et al.*, 2006; ESCRIBANO *et al.*, 2003), através da modificação do nível de hidratação da *stratum corneum* (HUA *et al.*, 2004), ou da perturbação da bicamada lipídica da pele (SINTOV e BOTNER, 2006).

A estrutura das microemulsões também desempenha um papel fundamental na veiculação transdérmica de substâncias bioativas. Para fármacos hidrossolúveis, por exemplo, as microemulsões do tipo O/A são preferíveis devido à maior capacidade de solubilização de compostos hidrofílicos e do efeito de hidratação da pele (LEE *et al.*, 2003). Geralmente, o inverso é observado para fármacos lipofílicos, onde as microemulsões do tipo A/O e bicontínuas são bastante utilizadas. Por outro lado, hidrogéis e organogéis de microemulsão vêm sendo amplamente estudados como veículos para a liberação transdérmica de fármacos (ALVAREZ-FIGUEROA e BLANCO-MÉNDEZ, 2001; DREHER *et al.*, 1997; ABOOFAZELI *et al.*, 2002).

Tabela 3.3 – Fármacos microemulsionados para administração transdérmica

Fármaco	Estudos	Referência
	Permeação <i>in vitro</i> Antiinflamatório <i>in vivo</i> Irritabilidade	(ESCRIBANO <i>et al.</i> , 2003)
Diclofenaco	Permeação <i>in vitro</i> Farmacocinético	(SINTOV e BOTNER, 2006)
	Permeação <i>in vitro</i>	(KANTARCI <i>et al.</i> , 2005)
	Permeação <i>in vitro</i>	(KWEON <i>et al.</i> , 2004)
Diclofenaco e indometacina	Permeação <i>in vitro</i>	(DREHER <i>et al.</i> , 1997)

Aceclofenaco	Permeação <i>in vitro</i>	(YANG <i>et al.</i> , 2002)
	Antiinflamatório <i>in vivo</i>	
Cetoprofeno	Permeação <i>in vitro</i>	(LEE <i>et al.</i> , 2005)
	Irritabilidade	(PAOLINO <i>et al.</i> , 2002)
Ibuprofeno	Permeação <i>in vitro</i>	(RHEE <i>et al.</i> , 2001)
		(CHEN <i>et al.</i> , 2006)
Piroxicam	Permeação <i>in vitro</i>	(PARK <i>et al.</i> , 2005)
	Antiinflamatório <i>in vivo</i>	(DALMORA <i>et al.</i> , 2001)
Triptolida	Permeação <i>in vitro</i>	(CHEN <i>et al.</i> , 2004)
	Irritabilidade	
Rofecoxibe	Permeação <i>in vitro</i>	(MEI <i>et al.</i> , 2003)
	Antiinflamatório <i>in vivo</i>	
Ácido níflúmico	Permeação <i>in vitro</i>	(DESAI, 2004)
	Antiinflamatório <i>in vivo</i>	
Ácido ascórbico e derivados	Permeação <i>in vitro</i>	(BOLZINGER <i>et al.</i> , 1998)
	Antioxidante <i>in vitro</i>	(JURKOVIC <i>et al.</i> , 2003)
Metotrexato	Antioxidante <i>in vitro</i>	(JURKOVIC <i>et al.</i> , 2004)
	Permeação <i>in vitro</i>	(TROTTA <i>et al.</i> , 1996)
Vinpocetina	Permeação <i>in vitro</i>	(ALVAREZ-FIGUEROA e BLANCO-MÉNDEZ, 2001)
	Irritabilidade	
5-fluorouracila	Permeação <i>in vitro</i>	(HUA <i>et al.</i> , 2004)
	Irritabilidade	(GUPTA <i>et al.</i> , 2005)
Difenidramina	Permeação <i>in vitro</i>	(SCHMALFUB <i>et al.</i> , 1997)
Estradiol	Permeação <i>in vitro</i>	(PELTOLA <i>et al.</i> , 2003)
Lidocaína e prilocaína	Permeação <i>in vitro</i>	(KREILGAARD <i>et al.</i> , 2000)
	Farmacocinético	(KREILGAARD, 2001)

	Farmacocinético Permeação <i>in vitro</i>	(SINTOV e SHAPIRO, 2004)
Lidocaína	Farmacocinético Anestésico <i>in vivo</i>	(KREILGAARD <i>et al.</i> , 2001)
	Permeação <i>in vitro</i>	(SINTOV e BRANDYS-SITTON, 2006)
Ametocaína	Analgésico <i>in vivo</i>	(AREVALO <i>et al.</i> , 2004)
	Analgésico <i>in vivo</i> Permeação <i>in vitro</i>	(ESCRIBANO <i>et al.</i> , 2005)
Tetracaína	Farmacocinético Analgésico <i>in vivo</i> Irritabilidade	(CHANGEZ <i>et al.</i> , 2006)
	Permeação <i>in vitro</i>	(CHANGEZ <i>et al.</i> , 2006)
Metoxsaleno	Permeação <i>in vitro</i>	(BAROLI <i>et al.</i> , 2000)
Indometacina	Permeação <i>in vitro</i>	(EL MAGHRABY, 2010)
Nicardipina	Permeação <i>in vitro</i>	(ABOOFAZELI <i>et al.</i> , 2002)
Nifedipina	Permeação <i>in vitro</i>	(BOLTRI <i>et al.</i> , 1994)
	Permeação <i>in vitro</i>	(THACHARODI e RAO, 1994)

3.1.4 Administração ocular de microemulsões

A administração de fármacos pela via ocular é bastante utilizada quando se deseja um efeito farmacológico tópico, isto é, restrito ao local de aplicação da dose, evitando assim, que o fármaco seja distribuído pela circulação sistêmica. No entanto, a aplicação oftálmica apresenta algumas desvantagens, principalmente com relação à baixa biodisponibilidade (1-10%) dos fármacos, que se deve à sua absorção dificultada pela córnea, ocasionada pela drenagem lacrimal (VANDAMME, 2002).

As microemulsões têm sido alvo de constante estudo, objetivando otimizar o potencial oftalmológico de diversas substâncias bioativas (Tabela 3.4). Geralmente, as microemulsões

de uso ocular são do tipo O/A, pois tal tipo de microestrutura presente permite a dissolução de fármacos lipofílicos na camada interfacial ou na fase oleosa interna, promovendo a liberação controlada do fármaco incorporado (HASSE e KEIPERT, 1997) e o aumento de sua estabilidade físico-química (LV *et al.*, 2005). Adicionalmente, as microemulsões não provocam prejuízos temporários à visão do paciente, tendo em vista que são sistemas opticamente isotrópicos (HASSE e KEIPERT, 1997). Microemulsões do tipo A/O voltadas para aplicação ocular também têm sido estudadas devido às possíveis diluições e transições de fase que podem ocorrer no olho após a sua aplicação (ALANY *et al.*, 2006).

A toxicidade das microemulsões de uso oftálmico deve ser levada em consideração a fim de se evitar possíveis danos à córnea e à retina. O uso de tensoativos e cotensoativos com toxicidade mínima é altamente recomendado. Dentre os tensoativos mais utilizados estão os polissorbatos, poloxâmeros e lecitinas (VANDAMME, 2002), e dentre os alcoóis utilizados como cotensoativo, aquele que apresenta menor toxicidade é o etanol (ALANY *et al.*, 2006), apesar de o propilenoglicol ser bastante utilizado (HASSE e KEIPERT, 1997; RICHTER e KEIPERT, 2004). Em 2006, LV *et al.* (2006) reportaram a obtenção de microemulsões livres de cotensoativo contendo uma mistura dos tensoativos Tween 20 e Span 20 para a aplicação ocular do cloranfenicol.

Tabela 3.4 – Fármacos microemulsionados para outras vias de administração

Fármaco	Estudos	Referência
<i>Intranasal</i>		
Diazepam	Farmacocinético	(LI <i>et al.</i> , 2002)
Clonazepam	Farmacocinético	(VYAS <i>et al.</i> , 2006)
Zolmitriptano	Farmacocinético	(VYAS <i>et al.</i> , 2005)
Nimodipina	Farmacocinético Toxicológico	(ZHANG <i>et al.</i> , 2004)
Sumatriptano	Caracterização físico-química Farmacocinético	(VYAS <i>et al.</i> , 2006)
<i>Intranasal e ocular</i>		
Androstenediona	Permeação <i>in vitro</i>	(RICHTER e KEIPERT, 2004)

Ocular

Cloranfenicol	Caracterização físico-química	(LV <i>et al.</i> , 2005)
	Caracterização físico-química	(LV <i>et al.</i> , 2006)
Prilocarpina	Miótica <i>in vivo</i> Biocompatibilidade	(HASSE e KEIPERT, 1997)

Subcutâneo

Quercetina	Antileishmaniose <i>in vivo</i> Toxicológico	(GUPTA <i>et al.</i> , 2005)
------------	---	------------------------------

Intravaginal

Vanadoceno	Toxicológico	(D'CRUZ e UCKUN, 2001)
------------	--------------	------------------------

3.2 PRODUTOS NATURAIS COMO FONTE DE FÁRMACOS

Durante um longo período, as plantas medicinais constituíram a base da medicina terapêutica e, somente em meados do século passado é que as substâncias puras isoladas ou sintetizadas, foram incorporadas ao arsenal terapêutico, tendo sido denominadas de fármacos. Os vegetais constituem uma grande e diversificada fonte de fármacos, pertencentes à classe de metabólitos especiais ou secundários que apresentam uma variedade enorme de atividades biológicas, muitas das quais podendo ser essenciais para a sobrevivência e o bem estar de humanos e animais (SOEJARTO e FARNSWORTH, 1989).

O uso de plantas medicinais com fins de prevenção, tratamento e cura de doenças, ultrapassou todas as barreiras dos processos evolutivos e sobrevive até os dias atuais, sendo amplamente utilizada por grande parte da população mundial como fonte de recurso terapêutico eficaz. No século XX o progresso científico possibilitou o estudo sistemático de um grande número de plantas, com conseqüente identificação de compostos bioativos. No final da década de 1980 estimou-se que 74% destes compostos teriam sido obtidos através de pesquisas que visavam comprovar a autenticidade das informações populares ou etnomédicas de vegetais medicinais (SOEJARTO e FARNSWORTH, 1989).

No período entre 1983 e 1994, dos 520 novos fármacos aprovados pela *Food and Drug Administration* (FDA), 203 (39%) foram desenvolvidos a partir de produtos naturais (CRAGG *et al.*, 1997). Dados reportados em 1985 mostram que a medicina alopática já utilizava aproximadamente 119 fármacos provenientes de 90 espécies de plantas superiores (FARNSWORTH e SOEJARTO, 1985). Dentre elas, 74% foram descobertas em pesquisas fitoquímicas que contemplaram a escolha da planta pelo seu uso na medicinal tradicional (FARNSWORTH e SOEJARTO, 1985).

Na década passada, estimou-se que entre os vinte principais fármacos mais vendidos nos Estados Unidos, apenas sete não eram derivados de produtos naturais. Em contrapartida, faziam parte do contexto histórico de drogas medicinais naturais, em decorrência de terem aspectos estruturais (semelhança em subunidades moleculares) e farmacológicos semelhantes a determinados produtos naturais. Atualmente, um terço dos medicamentos mais vendidos e prescritos no mundo, tem origem a partir de produtos naturais, o que equivale dizer que 40% dos medicamentos disponíveis na terapêutica atual foram desenvolvidos a partir de produtos naturais, onde 25% são de origem vegetal, 13% de microorganismos e 3% de animais (CALIXTO, 2003). O percentual se eleva para 70% quando se trata de drogas anticarcinogênicas e antibióticas (CALIXTO, 2003). Newman e colaboradores reforçam estes dados ao divulgarem em 2000, que 25% das receitas médicas de países industrializados derivam direta ou indiretamente de plantas. E estima ainda, que este percentual sobe para 50% quando se considera a comercialização de medicamentos em mercados populares (NEWMAN *et al.*, 2000).

3.2.1 Sistemas de liberação de fármacos e os produtos naturais

A principal classe de metabólitos especiais é, sem dúvida alguma, a dos alcalóides, como os extraídos dos gêneros *Vinca*, *Taxus* e *Camptotheca*, que apresentam intensa atividade antitumoral. Os alcalóides extraídos da *Vinca rosea*, como a vincristina e a vimblastina, são amplamente solúveis em água e representam o segundo fármaco antineoplásico mais utilizado no mundo (CORTESE e NASTRUZZI, 1999). Apesar disso, a alta incidência de efeitos adversos neurológicos causados pela administração de alcalóides da *Vinca* impedem a expansão de seu uso. Nesse sentido, diversos sistemas carreadores, em especial lipossomos e

microemulsões, foram obtidos e estudados para a veiculação desta importante classe de alcalóides (JUNPING *et al.*, 2003; HUA *et al.*, 2004; CHEN *et al.*, 2008).

O paclitaxel é um alcalóide extraído da espécie *Taxus brevifolia*, uma árvore nativa do Pacífico, sendo um dos mais efetivos agentes quimioterápicos utilizados no tratamento do câncer de ovário e mama. Ele é comercializado sob o nome de Taxol®, tendo como excipiente uma mistura 1:1 de Cremophor EL, um tensoativo derivado do óleo de rícino, e etanol, os quais são responsáveis pela alta incidência de efeitos adversos em pacientes tratados com Taxol®. Além disso, o paclitaxel apresenta baixíssima solubilidade aquosa, o que diminui consideravelmente a sua biodisponibilidade. Uma solução para estes problemas, tem sido o desenvolvimento e a otimização de sistemas de liberação para a veiculação do paclitaxel, como as microemulsões (RODRIGUES *et al.*, 2005; HE *et al.*, 2003), em especial os sistemas auto-microemulsificantes (KANG *et al.*, 2004; YANG *et al.*, 2004; GURSOY *et al.*, 2003; GAO *et al.*, 2003; LEE *et al.*, 2008). Outros compostos derivados do paclitaxel, como o docetaxel, também vêm sendo estudados em sistemas microemulsionados com o objetivo de aumentar sua biodisponibilidade oral (YIN *et al.*, 2009).

A camptotecina e seus análogos semissintéticos apresentam intensa atividade antitumoral frente a diversos modelos de tumores. No entanto, devido à sua baixa biodisponibilidade e aos seus intensos efeitos adversos, seu uso clínico prolongado tem sido evitado (CORTESE *et al.*, 1997; CORTESE e NASTRUZZI, 1999). O uso clínico deste importante alcalóide pode estar associado à utilização de sistemas de liberação controlada de fármacos, como lipossomos, microemulsões e sistemas micelares, que permitem diminuir a dose administrada e, conseqüentemente, diminuir os efeitos adversos, aumentando a sua biodisponibilidade (CORTESE *et al.*, 1997; CORTESE e NASTRUZZI, 1999; LU *et al.*, 2008).

Além dos alcalóides antineoplásicos, diversos outros fármacos de origem vegetal (WOO *et al.*, 2007; ZHANG *et al.*, 2008; MANDAWGADE *et al.*, 2008; LIU *et al.*, 2009; CUI *et al.*, 2009) têm sido introduzidos em sistemas microemulsionados. O principal motivo tem sido a baixa solubilidade destes produtos naturais, visando o aumento da sua biodisponibilidade.

Óleos vegetais também têm sido utilizados em sistemas microemulsionados como fase oleosa (BIRUSS *et al.*, 2007; MANDAWGADE *et al.*, 2008; STRICKLEY, 2004). Apesar de geralmente apresentarem uma extensa cauda apolar, o que dificulta o processo de micelização, a utilização de cotensoativos diminui a constante dielétrica da água e permite maior penetração das caudas apolares na fase aquosa.

3.3 MICELAS FORMADAS POR ALQUIL-GLICOSÍDEOS E SIMULAÇÃO POR DINÂMICA MOLECULAR

Tensoativos não-iônicos à base de açúcares, como os glicolípídeos e os alquil-poliglicosídeos, têm atraído a atenção devido à sua capacidade de biodegradação, baixa toxicologia (VON RYBINSKI e HILL, 1998), e pequena ou nenhuma dependência com a temperatura (AOUDIA e ZANA, 1998). A cabeça polar destes tensoativos pode consistir de um ou mais grupos sacarídeos, enquanto que a parte hidrofóbica pode consistir de uma, duas ou até mais cadeias alquílicas. A ligação química mais frequente entre as partes hidrofílica e hidrofóbica nesta classe de tensoativo são éter, éster, amina e amida. Tensoativos à base de açúcares exibem variado comportamento termotrópico e liotrópico, e podem apresentar fases cúbicas, hexagonais, lamelares, cristais líquidos e micelares em solução aquosa (DRUMMOND e WELLS, 1998; WALTON *et al.*, 2006; COPPOLA *et al.*, 2002; AUVRAY *et al.*, 1995). São ainda largamente empregados na extração e cristalização de membranas protéicas (ODAHARA, 2004), na emulsificação de substratos para reações enzimáticas (LAZO e QUINN, 1980) e como veículos para fármacos (SÖDERLIND *et al.*, 2003).

No entanto, a ocorrência natural de tensoativos à base de açúcares é geralmente pequena, além de serem de difícil isolamento (HOLMBERG, 2001). No final do século XX, uma nova família de tensoativos à base de açúcares proveniente de dissacarídeos desprotegidos foi introduzida na literatura (LATGE *et al.*, 1991; GARELLI-CALVET *et al.*, 1992). Eles consistem de uma cadeia alquílica ligada, por uma ligação amina, a um grupo açúcar, o qual pode estar na configuração aberta (alditol) ou de anel (aldose) (Figura 3.1), e sua síntese envolve apenas duas etapas de baixo custo (LATGE *et al.*, 1991; BHATTACHARYA e ACHARYA, 2000; GOMES, 2004). *N*-dodecilamino-1-deoxilactitol e *N*-dodecil-D-lactosilamina apresentam uma grande variedade de agregados e microestruturas em soluções aquosas e seu processo de micelização tem sido estudado por técnicas de espalhamento como SANS e SAXS (DUPUY *et al.*, 1996; DUPUY *et al.*, 1998). Com base nessas propriedades, têm-se estudado a possibilidade de utilizar tais tensoativos como agentes de solubilização de moléculas e fármacos hidrofóbicos, seja através de sistemas micelares ou de vesículas cataniônicas (BLANZAT, 2000; GOMES, 2004).

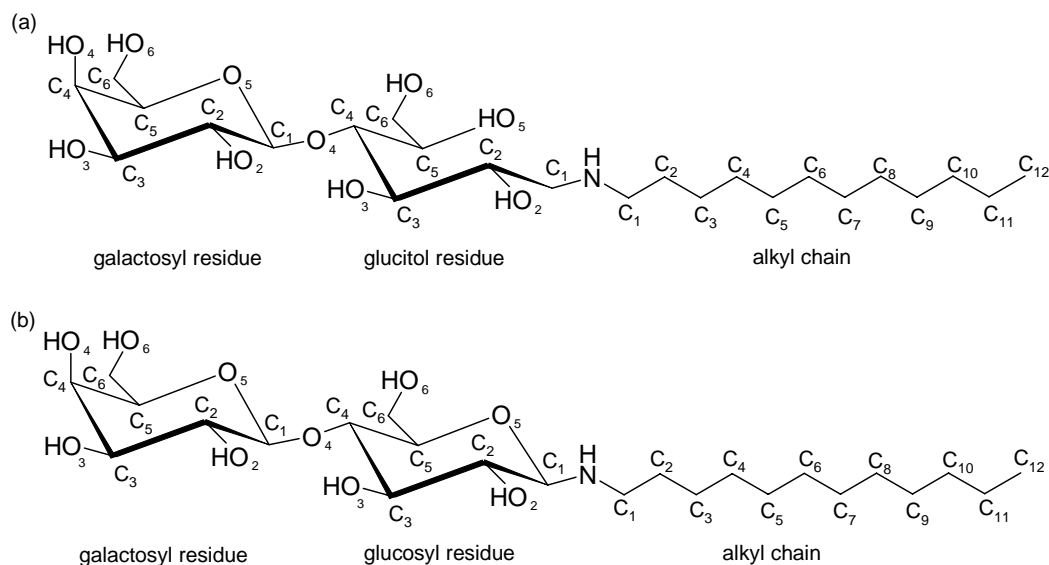


Figura 3.1 – Estrutura das moléculas de tensoativo (a) *N*-dodecilamino-1-deoxilactitol ($C_{12}N$ -lactitol) e (b) *N*-dodecil-D-lactosilamina ($C_{12}N$ -lactosil)

Simulações de Dinâmica Molecular (MD) têm demonstrado ser uma importante ferramenta para a investigação de propriedades micelares, e estudos recentes forneceram importantes informações a respeito do formato (KONIDALA *et al.*, 2006; BRUCE *et al.*, 2002; TIELEMAN *et al.*, 2000; BOGUSZ *et al.*, 2000; CHONG *et al.*, 2006), perfil de hidratação (FAEDER e LADANYI, 2005; FAEDER e LADANYI, 2001; BRUCE *et al.*, 2002), interações específicas (RAKITIN e PACK, 2004; FAEDER *et al.*, 2003) e propriedades dinâmicas das micelas (FAEDER e LADANYI, 2005; BOGUSZ *et al.*, 2001; MARRINK *et al.*, 2000) em soluções aquosas. A principal força atuante no processo de micelização é o efeito hidrofóbico (TANFORD, 1980), porém, em tensoativos à base de açúcares a extensa rede de ligações de hidrogênio observada na cabeça polar pode também exercer certa influência na micelização. Alguns estudos computacionais têm se destinado a estudar propriedades estruturais de compostos alquil-glicosídeos no processo de micelização em termos do tipo de ligação (alfa ou beta) entre a cadeia alquílica e o grupo açúcar (BOGUSZ *et al.*, 2000) e das posições axial ou equatorial dos grupos hidroxila (estereoquímica do grupo sacarídeo) (CHONG *et al.*, 2006).

Metodologia Experimental

4 METODOLOGIA EXPERIMENTAL

Neste capítulo são apresentados os materiais e métodos utilizados durante a execução deste trabalho.

4.1 ESCOLHA DOS COMPONENTES DA MICROEMULSÃO

Todos os produtos utilizados na formulação das microemulsões são farmacologicamente aceitáveis e foram utilizados sem prévia purificação (Tabela 4.1), à exceção do ácido oléico, que foi purificado em coluna cromatográfica contendo sílica (230-80 Mesh) e carvão ativado, e sua pureza foi confirmada pelo índice de refração.

Tabela 4.1 – Produtos utilizados na formulação das microemulsões

Produto	Fabricante	Pureza
<i>Tensoativos</i>		
Tween 80	Acros Organics	–
Tween 40	Acros Organics	–
Tween 20	Acros Organics	–
Span 20	Sigma-Aldrich	–
<i>Cotensoativos</i>		
Etanol P.A.	Cromato Química	99,5%
Propilenoglicol P.A.	Vetec	99,5%
Sorbitol	Sigma	> 98%
<i>Óleos</i>		
Miristato de isopropila	Acros Organics	96%
Ácido oléico	Synth	Purificado em coluna cromatográfica
Miglyol	Condea Chemie	–

4.2 PRODUTOS NATURAIS MICROEMULSIONADOS

Os clerodanos *trans*-desidrocrotonina (DCTN) e *trans*-crotonina (CTN), bem como o triterpeno ácido acetil aleuritólico (AAA) (Figura 2.10, página 42) foram obtidos a partir de estudos realizados previamente segundo metodologia descrita por MACIEL *et al.* (2000) e disponibilizados para uso neste trabalho.

Dentre os produtos bioativos isolados do *Croton cajucara* Benth, apenas o clerodano *trans*-desidrocrotonina foi purificado em coluna cromatográfica contendo sílica gel (230-80 Mesh). Após concentração das frações obtidas e de experimentos de cromatografia de camada delgada (TLC), as frações que tiveram a sua pureza assegurada foram reunidas e disponibilizadas para uso.

4.2.1 Extratos vegetais

Os extratos hexânico (CC-EH), clorofórmico (CC-EC) e metanólico (CC-EM) provenientes das folhas de *Croton cajucara*, bem como os terpenóides isolados, foram obtidos de acordo com a metodologia previamente descrita (MACIEL *et al.*, 2000). A planta foi adquirida no mercado Ver-o-peso (Belém-PA) e sua autenticidade comprovada por experimentos fitoquímicos que foram monitorados por comparações em cromatografia em camada delgada (TLC) com padrões autênticos de DCTN, CTN e AAA.

As cascas do caule de *Anacardium occidentale* L. foram coletadas em Natal (RN) e a identificação botânica da espécie foi realizada pela botânica Maria Iracema Bezerra Loiola. Uma exsicata elaborada foi depositada no herbário da Universidade Federal do Rio Grande do Norte. O material vegetal (1,3 kg) foi fragmentado em pequenos pedaços e submetido à extração via percolação com metanol. O extrato metanólico obtido (AO-EM) (62,3 g) foi submetido a um procedimento cromatográfico em gel de sílica, e forneceu uma fração apolar (eluída em hexano) correspondente ao óleo fixo (AO-FO), uma fração de polaridade mediana (eluída em clorofórmio), uma fração polar (eluída em metanol) e uma fração muito polar (eluída em metanol:água, 8:2) rica em taninos (AO-FT) (GOMES *et al.*, 2006).

Phyllanthus amarus Schumm. & Thonn foi coletado em Natal (RN) e a identificação botânica da espécie foi realizada pela botânica Maria Iracema Bezerra Loiola. Uma exsicata

foi elaborada (n° 1645) e depositada no herbário da Universidade Federal do Rio Grande do Norte. O material vegetal seco (124,5 g da planta inteira) foi submetido à extração via percolação com metanol. O filtrado obtido foi reduzido em um rotaevaporador, gerando 16,9 g do extrato alcoólico de *Phyllanthus amarus* (PA-EE) (MACIEL *et al.*, 2007).

4.3 OBTENÇÃO DOS DIAGRAMAS DE FASES

Os diagramas de fases pseudo-ternários foram elaborados a partir da diluição com a fase aquosa de pré-misturas de tensoativo/cotensoativo e fase oleosa a várias composições, verificando sempre após cada adição do titulante, e posterior agitação em vortex, qualquer mudança no aspecto físico da mistura. Quando necessário, foi feita também a diluição de pré-misturas de tensoativo/cotensoativo e água com a fase oleosa. Em todos os diagramas foram obtidas apenas as regiões de ocorrência das microemulsões, ignorando-se as fases existentes nas demais regiões.

4.4 TESTES DE SOLUBILIDADE

A quantificação do fármaco foi determinada por espectroscopia no UV-Vis a partir de sucessivas diluições em metanol. Inicialmente, foi obtida uma curva de calibração tomando-se uma massa conhecida do fármaco, o qual foi dissolvido em 1,0 mL de metanol. Em seguida, determinou-se a absorbância das amostras contendo o fármaco após diversas diluições em metanol.

Para a determinação da solubilidade da DCTN e CTN nos sistemas microemulsionados, ou em um de seus componentes isolados, procedeu-se da seguinte maneira: em um tubo de ensaio foi colocado 1,0 mL do veículo (microemulsão ou um de seus componentes) e em seguida adicionou-se o fármaco até que se verificasse a saturação do sistema (formação de precipitado em suspensão) após um mínimo de 10 minutos de agitação (vortex). Em seguida, a mistura foi agitada em um banho termostático, por 24 h, à temperatura ambiente (27 ± 1 °C). Por fim, as amostras foram centrifugadas por 10 minutos a 2800 rpm e pequenas alíquotas do sobrenadante foram analisadas por espectroscopia no UV-Vis, cujas medidas de absorbância

foram realizadas em triplicata a fim de se calcular a concentração do fármaco nos sistemas microemulsionados a partir da curva de calibração.

Para os sistemas auto-microemulsificantes foi realizado um teste de retenção do fármaco na microemulsão à medida que esta é diluída em água. Uma quantidade pré-determinada do produto natural foi solubilizada no sistema auto-microemulsificante, o qual, em seguida, foi diluído em três vezes (D1) e depois em trinta vezes (D2) à concentração inicial. A quantidade do produto natural dissolvida na microemulsão original (D0) e diluída (D1 e D2) foi determinada por espectroscopia no UV-Vis a partir de sucessivas diluições em metanol, de forma similar ao procedimento realizado para os sistemas microemulsionados convencionais. Todas as análises de UV-Vis, para cada diluição, foram realizadas em triplicata.

Para a determinação da solubilidade dos extratos nos sistemas microemulsionados, a curva de calibração foi obtida solubilizando-se 1,0 g do extrato em 1,0 mL do próprio sistema microemulsionado testado e, posteriormente, realizada a leitura da absorbância, no comprimento de onda máximo de cada extrato, de soluções diluídas a partir desta solução inicial. O restante da metodologia seguiu o protocolo descrito acima para os ensaios de solubilidade dos produtos naturais de *Croton cajucara* (DCTN e CTN).

4.5 CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DAS MICROEMULSÕES

Os sistemas microemulsionados obtidos foram caracterizados quanto ao índice de refração, comportamento reológico, tamanho das gotículas e condutividade elétrica.

4.5.1 Índice de refração

O índice de refração foi obtido em um refratômetro Abbé Leica Auto, da Tecnal (Piracicaba, São Paulo) a temperatura ambiente (25 °C).

4.5.2 Reologia

Os dados de viscosidade foram obtidos em um reômetro Haake Mars, utilizando o software RheoWin 3 Job Manager. Foram empregados em todas as análises o rotor Z41. Foi utilizado o modo de variação de tensão a uma taxa de cisalhamento constante dentro do período de rotação que variou de 1 a 150 s⁻¹. A temperatura em todas as análises foi de 25 ± 0,5 °C. O comportamento reológico de cada sistema microemulsionado foi avaliado a partir do gráfico gerado pelos valores da tensão versus taxa de cisalhamento, obtidos no decorrer de 120 segundos de experimento. Os sistemas que apresentaram comportamento linear (valor de $r^2 \geq 0,9999$) no gráfico gerado foram considerados fluidos Newtonianos e sua viscosidade foi determinada pelo software RheoWin 3 Job Manager como o coeficiente angular da curva. Os sistemas considerados não-Newtonianos tiveram sua viscosidade determinada a partir do coeficiente angular da linha de tendência do gráfico tensão versus taxa de cisalhamento, gerado a partir de no mínimo 100 pontos.

4.5.3 Distribuição de tamanho das gotículas

O tamanho das gotículas de microemulsão foi determinado em um instrumento zetasizer da Brookhaven Instruments. Todas as medidas foram realizadas em triplicata a temperatura constante de 25,0 °C e com um feixe de luz de comprimento de onda de 659,0 nm, com um ângulo de incidência de 90,0°. Todas as amostras utilizadas foram recém-preparadas e agitadas durante 10 minutos antes da análise.

4.5.4 Condutividade elétrica

As determinações de condutividade elétrica, k , foram realizadas em um condutivímetro Digimed DM-31 equipado com um eletrodo cuja constante da célula era 0,77 cm⁻¹. Todas as medidas de condutividade foram realizadas em triplicata a temperatura controlada de 25 ± 0,5 °C.

4.6 ESTUDO DAS PROPRIEDADES ANTIOXIDANTE E BACTERIOSTÁTICA

Os ensaios farmacológicos dos extratos solubilizados em sistemas microemulsionados consistiram da avaliação da propriedade antioxidante e do efeito bacteriostático, realizados em parceria com laboratórios do departamento de Química da UFRRJ e do departamento de Biologia e Genética da UFRN.

4.6.1 Propriedade antioxidante

A ação antioxidante dos extratos vegetais solubilizados em sistemas microemulsionados foi avaliada utilizando-se como fonte de radical livre o 2,2-difenil-picril-hidrazila (DPPH) (MENSOR *et al.*, 2001). As soluções-estoque foram preparadas em metanol na concentração de 1 mg/mL. O ensaio foi realizado em microplacas de 96 poços no volume total de 100 µL. Foram feitas diluições dos extratos e frações testados, às quais foi ajuntada uma solução de 0,3 mM de DPPH em metanol. Após o tempo de 30 minutos de repouso no escuro, foi feita a leitura das microplacas em leitora Elisa a 490 nm. Foram realizados três ensaios independentes, todos em triplicata. O percentual antioxidante foi calculado a partir da seguinte equação:

$$\%AA = 100 - (A_{\text{amostra}} - A_{\text{branco}}) \times 100 / A_{\text{controle}} \quad (8)$$

Onde: A_{amostra} = absorbância da amostra correspondente ao extrato com DPPH; A_{branco} = absorbância do branco correspondente ao extrato sem DPPH; A_{controle} = absorbância da solução pura de DPPH a 0,3 mM.

A atividade antioxidante foi expressa em valores de $CE_{50} \pm dp$ (concentração efetiva na captura de 50% do radical livre DPPH e desvio-padrão, respectivamente), obtidos a partir do gráfico que relaciona o percentual de atividade antioxidante (%AA) com a concentração de cada extrato testado.

4.6.2 Atividade bacteriostática

Foi realizado o inóculo de uma colônia para cada espécie bacteriana testada em 5 mL de meio de cultura LB (Luria Broth), incubados por 16-18 h, a 37 °C, sob agitação de 180 rpm. Após esse período, 5 µL do cultivo descrito foi adicionado a diferentes concentrações da amostra a ser testada e ao meio de cultura, perfazendo um volume final de 100 µL. As amostras foram então incubadas por 24 h, a 37 °C, sem agitação. Após o período de incubação, o crescimento microbiano foi observado e determinado como a medida de absorvância obtida através de espectrometria no UV-Vis em comprimento de onda de 600 nm. Como controle positivo foi utilizada uma combinação dos antibióticos ampicilina (2 µg/mL) e cloranfenicol (12,5 µg/mL).

4.7 SIMULAÇÃO POR DINÂMICA MOLECULAR DE MICELAS

Moléculas de *N*-dodecilamino-1-deoxilactitol (C₁₂N-lactitol) e *N*-dodecil-D-lactosilamina (C₁₂N-lactosil) foram modeladas utilizando o campo de força GLYCAM_04 (WOODS GROUP, 2007). Os parâmetros ausentes foram obtidos a partir do módulo antechamber (WANG *et al.*, 2006) da suíte de programas AMBER 9.0 (CASE *et al.*, 2006). As cargas parciais atômicas foram obtidas utilizando o algoritmo RESP, derivando as cargas de potenciais eletrostáticos calculados no nível HF/6-31G* a partir do programa GAMESS. Duas micelas esféricas contendo 88 monômeros de C₁₂N-lactitol e C₁₂N-lactosil foram construídas empregando-se um software criado pelo grupo. Cada micela foi solvatada com aproximadamente 17.000 moléculas de água do tipo TIP3P em uma célula periódica de formato octaédrico com dimensões iniciais $a = b = c = 119,0 \text{ \AA}$, gerando uma concentração de 0,25 M ou 87,2% (m/m) de água. Esta configuração inicial está consideravelmente acima da CMC ($6 \times 10^{-4} \text{ mol/L}$) para o C₁₂N-lactitol e está de acordo com estudos experimentais que revelaram um número de agregação de 88 a 297 K (24 °C) (DUPUY *et al.*, 1996; DUPUY *et al.*, 1998).

As simulações de Dinâmica Molecular (MD) foram realizadas usando a suíte de programas AMBER 9.0 (CASE *et al.*, 2006). O raio de corte foi fixado em 9,0 Å e todas as interações eletrostáticas de longo alcance foram tratadas pelo método *Particle Mesh Ewald*

(PME). Como sugerido por KIRSCHNER e WOODS (2001), as interações de van der Waals do tipo 1-4 (scnb) e as interações eletrostáticas do tipo 1-4 (scee) foram fixadas em 1. A geometria molecular foi preservada utilizando o algoritmo SHAKE (RYCKAERT *et al.*, 1997) e as equações de movimento foram integradas com um intervalo de tempo de 2 fs.

Inicialmente, os sistemas solvatados tiveram a sua energia minimizada utilizando 500 passos do método *Steepest Descent* (SD), seguido de 2.000 passos do método de gradiente conjugado, mantendo a micela fixa. Uma outra etapa de minimização foi realizada, desta vez deixando a micela livre, a fim de eliminar maus contatos antes da etapa de termalização. Em seguida, os sistemas foram aquecidos de 0 a 298 K a volume constante em um intervalo de 100 ps usando a técnica de Langevin com uma frequência de colisão de $25,0 \text{ ps}^{-1}$. Finalmente, uma simulação MD no ensemble NpT foi realizada para cada sistema em um intervalo de 10 ns, a 1 atm e 298 K, com coordenadas arquivadas a cada 0,5 ps. Os primeiros 500 ps da simulação foram considerados como etapa de equilíbrio e o restante como a etapa de produção.

O cálculo do raio de giro e a análise das ligações de hidrogênio foram realizados a partir do módulo ptraj da suíte de programas AMBER. Para avaliar as interações monômero-solvente e inter- e intra-monômeros, a ligação de hidrogênio foi definida baseada em dois critérios geométricos: (i) distância oxigênio-oxigênio máxima de $3,0 \text{ \AA}$, e (ii) ângulo da ligação O-H...O superior a 120° . Foram ainda considerados os átomos de nitrogênio e oxigênio como aceptores de hidrogênio, e quando apropriado, o correspondente átomo de hidrogênio como doador. A área superficial acessível ao solvente (SASA) dos agregados foi calculada usando o programa NACCESS (HUBBARD e THORNTON, 1993). Para os cálculos de SASA foram definidos raios atômicos de 1,8; 1,6; 1,4 e $0,0 \text{ \AA}$ para os átomos de C, N, O e H, respectivamente, além de um raio de prova de $1,4 \text{ \AA}$ com espessura de $0,05 \text{ \AA}$.

Resultados e Discussão

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 ESCOLHA DOS COMPONENTES DA MICROEMULSÃO

Inicialmente, a escolha dos componentes (tensoativo, cotensoativo e fase oleosa) das microemulsões seguiu o critério de toxicidade, em virtude da aplicação biológica dos sistemas microemulsionados obtidos. Na sequência, procurou-se utilizar componentes que permitissem a obtenção de extensas regiões de microemulsão em um diagrama de fases.

5.1.1 Escolha do tensoativo

Para a obtenção dos sistemas microemulsionados foram selecionados tensoativos não-iônicos, já que são inertes a variações de pH e apresentam baixa toxicidade (STRICKLEY, 2004). Nesse contexto, foram testados os tensoativos Tween 80, 40 e 20, e o Span 20, que são líquidos à temperatura ambiente, bem como misturas Tween/Span em várias proporções.

O Span 20 é um éster do sorbitol bastante lipofílico (Tabela 2.1, página 42), apresentando, portanto, um baixo BHL. Misturas contendo apenas o Span 20 como tensoativo tenderam a formar emulsões nas composições ricas em óleo, e géis ou cristais líquidos nas composições ricas no tensoativo. A utilização de Tweens (80, 40 e 20) como tensoativo estendeu um pouco a região de microemulsão, porém verificou-se ainda a existência de uma ampla região de cristais líquidos nas composições ricas em tensoativo e também em certas regiões próximas ao vértice da água.

Os tensoativos não-iônicos tendem a formar com maior facilidade microestruturas gelificadas em composições com alta concentração do tensoativo. A interação do tensoativo com moléculas de água permite a formação de um arranjo estrutural rígido, como as fases cúbicas, lamelares ou hexagonais de alta viscosidade. Tais microestruturas tendem a limitar o potencial de aplicação das microemulsões como veículo de fármacos, devido ao seu comportamento reológico. Uma forma simples e útil de verificar a tendência da formação de géis por parte desse tipo de tensoativo pode ser feita através do estudo de uma mistura binária tensoativo-água. Desta forma, foi realizado o estudo liotrópico de sistemas contendo os

tensoativos hidrofílicos Tween 20, 40 e 80 em mistura com o Span 20, em três diferentes proporções, com o objetivo de se eleger a melhor proporção dos tensoativos empregados em cada sistema, ou seja, aquele que apresenta a menor tendência à formação de gel. (Figura 5.1). Para as misturas Tween 80/Span 20 (T80:S20) e Tween 20/Span 20 (T20:S20) a proporção que apresentou a maior resistência à gelificação foi 3:1 (Tween : Span), enquanto que para o sistema Tween 40/Span 20 (T40:S20) a razão escolhida foi 2:1.

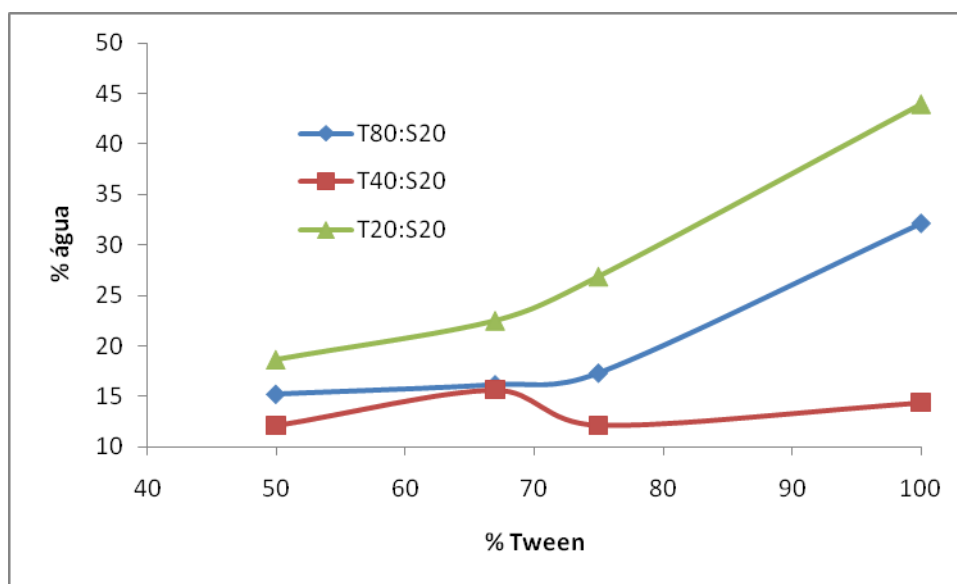
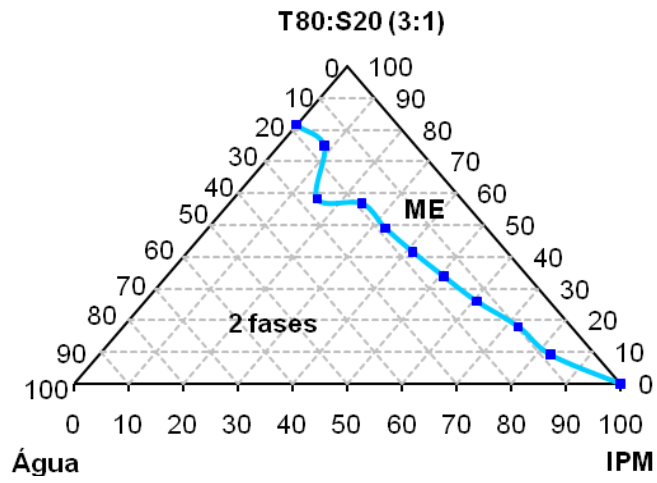


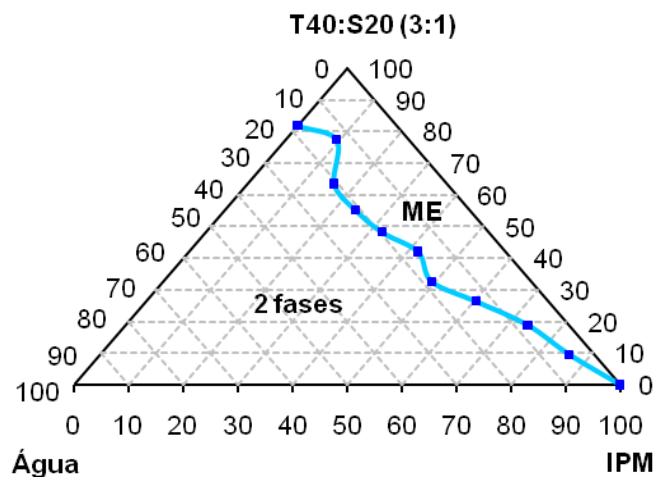
Figura 5.1 – Capacidade máxima de formação de misturas isotrópicas em função quantidade de água, variando-se a proporção entre os tensoativos Tween e Span 20.

A partir da definição das proporções de cada sistema de tensoativo foi obtido um diagrama de fases ternário, utilizando o miristato de isopropila (IPM) como fase oleosa (Figura 5.2). O resultado demonstrou que a utilização de um tensoativo bastante hidrofílico como o Tween 20 inibiu a formação de microemulsão em regiões ricas em óleo, e estendeu um pouco a região de microemulsão em direção ao vértice da água. Os sistemas T80:S20 (3:1) e T40:S20 (2:1) apresentaram diagramas parecidos. Entretanto, a utilização do Tween 80 permitiu a formação de microemulsões A/O com pelo menos 5% em massa de água. Por isso, o sistema T80:S20 (3:1) foi utilizado na preparação de todos os sistemas microemulsionados deste trabalho.

(a)



(b)



(c)

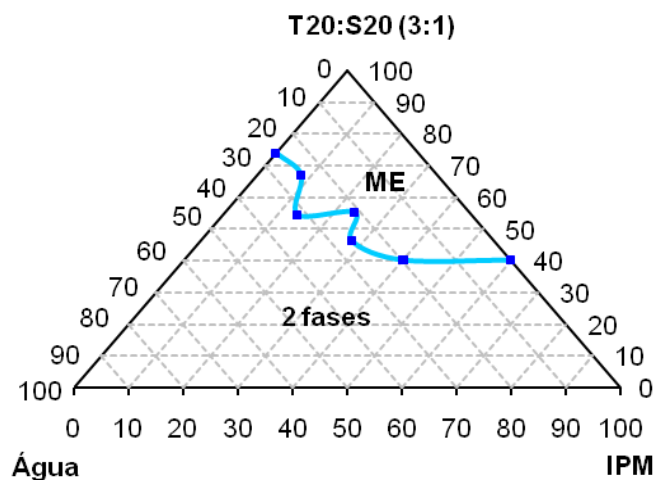


Figura 5.2 – Diagramas de fases de misturas contendo Tween:Span 20 (3:1), IPM e água. (a) Tween 80; (b) Tween 40; (c) Tween 20

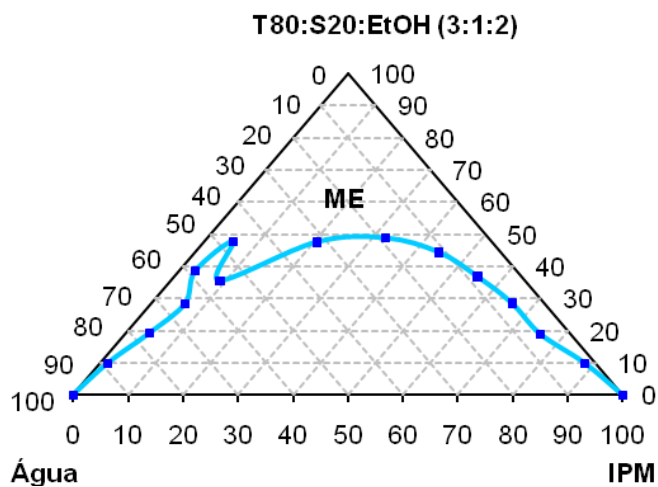
A utilização de misturas de tensoativos de BHL distintos é um recurso bastante utilizado, pois o efeito sinérgico entre eles pode ampliar a região de microemulsão, bem como garantir ou melhorar certas propriedades físico-químicas da formulação (LI *et al.*, 2005; KIM *et al.*, 2005). Observou-se, neste caso, a diminuição da região de cristais líquidos nas composições próximas ao eixo tensoativo-água, devido principalmente ao abaixamento do balanço hidrófilo-lipófilo (BHL) da mistura de tensoativos utilizada, que contribuiu para uma melhor interação com a água. De fato, o Span 20, que é um tensoativo bastante lipofílico, pode atuar como fase oleosa estabilizando a região lipofílica do Tween 80.

5.1.2 Escolha do cotensoativo

Os cotensoativos têm como principal função aumentar a fluidez do filme de tensoativo formado, estabilizando os microdomínios formados de óleo em água ou de água em óleo. Nesse contexto, são usados geralmente alcoóis de cadeia média como o butanol e o hexanol. No entanto, estes alcoóis são bastante tóxicos, mostrando-se inapropriados para uso farmacológico. Uma alternativa é o uso do etanol como cotensoativo. Apesar do etanol não apresentar a mesma capacidade de penetração no filme interfacial que seus homólogos de cadeia maior, este álcool apresenta toxicidade bastante inferior em comparação com os alcoóis superiores, e por isso é largamente utilizado em microemulsões para uso farmacológico (RUTH *et al.*, 1995; ZHANG *et al.*, 2005; ALANY *et al.*, 2006).

Neste trabalho, o etanol foi testado como cotensoativo em duas concentrações: na razão Cotensoativo/Tensoativo (C/T) igual a 0,5 e 1,0 (Figura 5.3). Na mistura com menores quantidades de etanol (C/T igual a 0,5) observou-se um pequeno estreitamento da região de microemulsão próxima ao vértice da água em comparação com a mistura com C/T igual a 1. Nas composições ricas em fase oleosa, os dois sistemas apresentaram comportamento similar. Apesar de ser preferível a utilização de quantidades mínimas de etanol em virtude de sua toxicidade, o sistema com razão C/T igual a 1 foi escolhido, levando-se em conta a possibilidade de migração do álcool para o meio externo, que pode levar à desestabilização e consequente quebra da microemulsão.

(a)



(b)

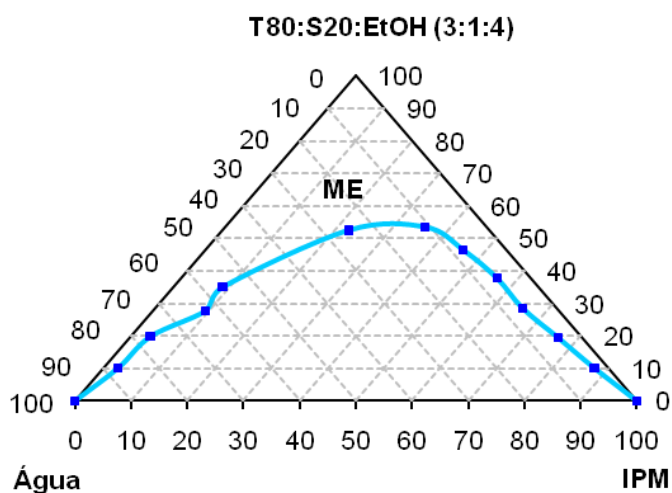


Figura 5.3 – Diagramas de fases de misturas contendo Tween 80:Span 20 (3:1) e etanol nas razões (a) C/T igual a 0,5 e (b) C/T igual a 1,0

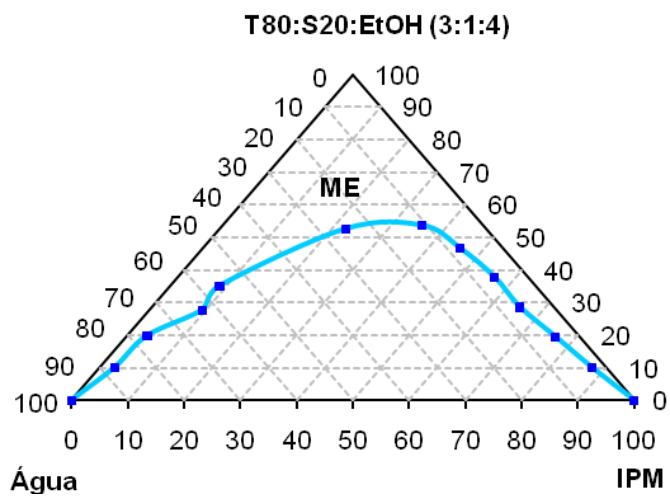
Além de permitir a estabilização da fase dispersa, o cotensoativo possui a capacidade de tornar a fase aquosa menos hidrofílica a partir da diminuição da constante dielétrica da água. Como resultado, haverá maior penetração da parte hidrofóbica do tensoativo na fase aquosa e, conseqüentemente, maior estabilização das gotículas (O/A ou A/O) formadas na microemulsão, como pode ser observado comparando-se os diagramas de fase da Figura 5.3 com o da Figura 5.2a (região de microemulsão mais extensa em sistemas com cotensoativo).

5.1.3 Escolha da fase oleosa

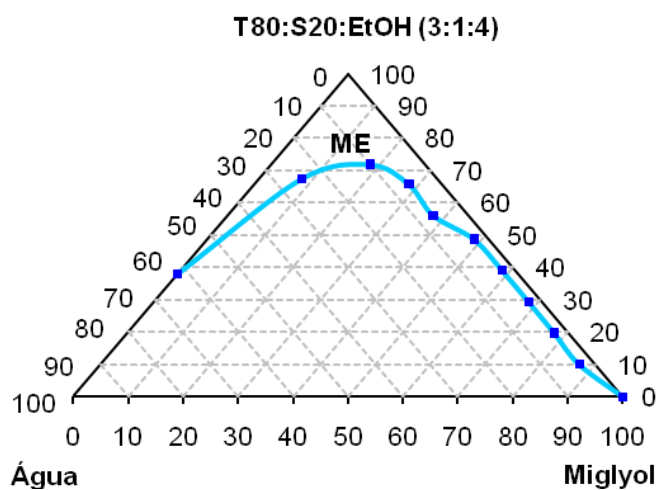
Em microemulsões de uso biológico é preferível a utilização de óleos com cadeia hidrocarbônica relativamente curta à média. Isso porque tais sistemas frequentemente apresentam cotensoativos com cadeias bastante curtas, como o etanol, o que dificulta a sua penetração no filme interfacial e a sua consequente estabilização. Assim, óleos com cadeias mais curtas tendem a penetrar mais no filme interfacial auxiliando também na sua estabilização.

Dentre os óleos testados, o miristato de isopropila (IPM) se sobressaiu frente aos demais por apresentar a maior região de microemulsão (Figura 5.4). O Miglyol, apesar de possuir uma cadeia hidrocarbônica menor que o IPM, apresenta em sua estrutura três cadeias hidrocarbônicas (Tabela 2.2, página 46), resultando em uma alta lipofilicidade e rigidez da molécula, o que justifica a estreita região de microemulsão observada quando é utilizado este óleo como fase oleosa. Por isso, o Miglyol não foi empregado em nenhum sistema microemulsionado deste trabalho. O ácido oléico (AO), por sua vez, apresenta a maior cadeia hidrocarbônica, porém a insaturação presente em sua estrutura lhe confere maior fluidez por comparação com os demais óleos testados. Adicionalmente, o ácido oléico é bastante utilizado em formulações tópicas por ser um bom promotor de permeação dérmica (ESCRIBANO *et al.*, 2003). Porém, o alto caráter lipofílico do ácido oléico restringiu a formação de microemulsões do tipo O/A (região de microemulsão próxima ao vértice da água), apesar de ter facilitado a ocorrência de microemulsões do tipo A/O (região de microemulsão próxima ao vértice do óleo).

(a)



(b)



(c)

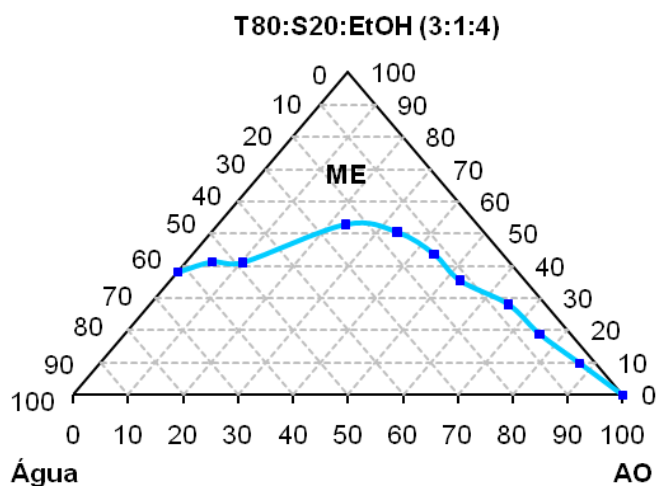


Figura 5.4 – Diagramas de fases de misturas contendo (a) IPM, (b) Miglyol e (c) ácido oléico como fase oleosa

5.2 OBTENÇÃO DOS SISTEMAS MICROEMULSIONADOS

A partir da análise dos diagramas de fase obtidos foram escolhidas várias composições na região de microemulsão de cada diagrama (Tabela 5.1), contemplando as microestruturas bicontínuas, do tipo óleo em água (O/A) e do tipo água em óleo (A/O) (Figura 2.8, página 34). Entretanto, devido ao alto caráter lipofílico do ácido oléico, os sistemas contendo este óleo se restringiram às microemulsões bicontínuas e do tipo A/O.

O sistema ME-A do tipo O/A (microemulsão rica em fase aquosa) tem, preferencialmente, indicação para a solubilização e veiculação de substâncias polares de caráter hidrofílico. Em um contexto geral, este tipo de sistema (O/A) é utilizado para administração parenteral (PARK e KIM, 1999) e transdérmica (CHANGEZ *et al.*, 2006) de fármacos.

Por sua vez, os sistemas ME-C e ME-F são microemulsões ricas em fase oleosa (tipo A/O), que são empregadas na veiculação de fármacos lipofílicos ou apolares, principalmente a partir da via transdérmica (BAROLI *et al.*, 2000), já que podem atuar como adjuvantes na permeação dérmica do fármaco.

Os sistemas ME-B e a ME-E são microemulsões do tipo bicontínua e se caracterizam por uma alta viscosidade e quantidades equivalentes de fase aquosa e oleosa. Diante dessas características, são largamente empregados na administração transdérmica (ESCRIBANO *et al.*, 2003) e intranasal (LI *et al.*, 2002) de fármacos das mais variadas classes e polaridades.

Tabela 5.1 – Composição das Microemulsões (ME) (% em massa)

	ME-A	ME-B	ME-C	ME-D	ME-E	ME-F
Tween 80	13,12%	22,5%	18,75%	22,5%	22,5%	15,0%
Span 20	4,38%	7,5%	6,25%	7,5%	7,5%	5,0%
Etanol	17,5%	30,0%	25,0%	—	30,0%	20,0%
IPM	5,0%	20,0%	45,0%	65,0%	—	—
Ácido oléico	—	—	—	—	20,0%	55,0%
Água	60,0%	20,0%	5,0%	5,0%	20,0%	5,0%

Com o intuito de se evitar a utilização do etanol foi obtido um diagrama de fases cujo sistema não apresentava cotensoativo (Figura 5.2a). O sistema foi composto da mistura Tween 80:Span 20 (3:1), IPM e água, tendo apresentado uma considerável região de microemulsão. Assim como os sistemas ME-C e ME-F, o sistema ME-D, obtido sem uso de etanol, é uma microemulsão do tipo A/O, rica em fase oleosa. Este sistema se difere das microemulsões com etanol por apresentar maior viscosidade, devido à menor fluidez da camada interfacial ocasionada pela ausência do cotensoativo. Comparativamente, o sistema ME-D representa a melhor proposta de veiculação de fármacos, em função de não conter etanol.

5.2.1 Obtenção dos sistemas auto-microemulsificantes

Os sistemas auto-microemulsificantes são constituídos de uma mistura isotrópica de tensoativos, cotensoativos, óleo e fármaco, sendo bastante utilizados na administração oral de fármacos com baixa biodisponibilidade oral. Uma propriedade importante destes sistemas é que o aspecto isotrópico da microemulsão permanece inalterado mesmo após sucessivas diluições com água. Isso é muito importante, pois no sistema digestivo as microemulsões são diluídas ou “absorvem” a água do trato gastrointestinal, podendo ocorrer a quebra da microemulsão.

Dentre os vários sistemas testados, dois deles apresentaram regiões propícias para a formulação de sistemas auto-microemulsificantes (Figura 5.5). Essas regiões podem ser identificadas pela área compreendida entre as linhas pontilhadas que percorrem o diagrama de fases, partindo do eixo binário tensoativo/cotensoativo-óleo até o vértice da água. Ambos os sistemas foram diluídos em até trinta vezes e não se verificou a quebra da microemulsão. Entretanto, os sistemas apresentaram mudança de coloração do amarelo (devido à alta concentração do Tween 80 e Span 20 no sistema inicial) para um tom levemente azul, característico de partículas coloidais de tamanho nanométrico, o que pode sugerir a coalescência das gotículas de microemulsão quando esta é diluída.

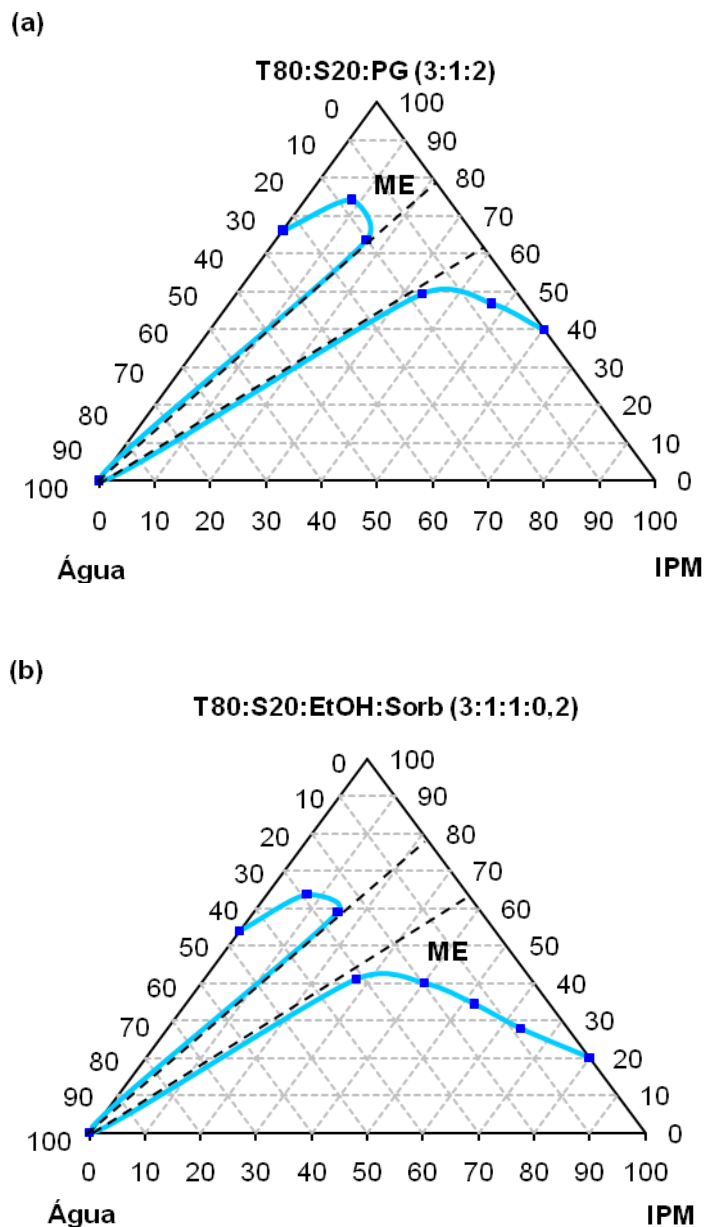


Figura 5.5 – Diagramas de fases a partir dos quais foram obtidos os sistemas auto-microemulsificantes (a) ME-G e (b) ME-H. A região entre as duas linhas pontilhadas indica a região propícia para formulação de sistemas auto-microemulsificantes.

O sistema ME-G é composto de 46,66% em massa da mistura Tween 80:Span 20 (3:1), que foi o tensoativo utilizado, 23,33% de propilenoglicol (PG) como cotensoativo, e 30,0% de IPM, utilizado como fase oleosa. Para este sistema de uso oral, o etanol foi substituído pelo propilenoglicol, que é um álcool mais tolerável que o primeiro. Por sua vez, o sistema auto-microemulsificante ME-H contém em sua composição 52,29% da mistura Tween 80:Span 20 (3:1), 13,06% de etanol (EtOH), 2,65% de sorbitol (Sorb), 25,0% de IPM e 7,0% de água bidestilada, que foi utilizada para solubilizar o sorbitol. Neste sistema, o sorbitol foi utilizado

com o objetivo de diminuir a quantidade de etanol utilizada e garantir a estabilidade da microemulsão após sucessivas diluições com água, já que apesar de ser um açúcar, o sorbitol é freqüentemente utilizado como adjuvante na formação de microemulsões do tipo O/A (KTISTIS, 1990; PARK e KIM, 1999). O mecanismo de atuação do sorbitol na microemulsão ainda não está completamente elucidado, porém experimentos de espalhamento de luz comprovaram que microemulsões contendo sorbitol tendem a apresentar gotículas com tamanho duas vezes maior que os sistemas sem sorbitol (PARK e KIM, 1999).

5.3 TESTES DE SOLUBILIDADE

Um dos grandes desafios da indústria farmacêutica atualmente é a veiculação de compostos bioativos pouco solúveis em água. Dados recentes mostraram que aproximadamente 35-40% de todos os novos compostos químicos, isolados ou sintetizados, apresentam baixa solubilidade aquosa (GODDEERIS *et al.*, 2006; KOGAN e GART, 2006). Nesse sentido, as microemulsões tornam-se valiosos instrumentos na veiculação desses compostos, pois são capazes de solubilizá-los nos microdomínios da fase dispersa e, em especial, na camada interfacial, aumentando, assim, a sua biodisponibilidade (NARANG *et al.*, 2007).

Neste trabalho, a solubilidade dos produtos naturais DCTN, CTN e AAA, bem como dos extratos vegetais, foi avaliada a partir do cálculo da sua concentração em uma microemulsão (ou uma solução de um dos seus componentes) saturada com precipitado visível. Dessa forma, pôde-se garantir que ao se retirar uma alíquota do sobrenadante, após centrifugação, e calcular a concentração do produto nesta alíquota, obteve-se a sua solubilidade nesta solução após fazer todos os cálculos referentes às diluições realizadas.

5.3.1 Solubilização da *trans*-desidrocrotonina

A quantificação do produto natural bioativo *trans*-desidrocrotonina (DCTN) foi realizada por espectroscopia no UV-Visível, em todos os sistemas microemulsionados convencionais (ME-A ao ME-F), bem como em certos componentes isoladamente, tais como

Tween 80, IPM, água bidestilada, ácido oléico, Miglyol e propilenoglicol (Tabela 5.2). O comprimento de onda máximo ($\lambda_{\text{máx}}$) encontrado para a DCTN foi 238 nm, em metanol a temperatura ambiente. O $\lambda_{\text{máx}}$ encontrado para os sistemas microemulsionados usados neste trabalho variou de 215 a 230 nm, de modo que não houve sobreposição significativa com o comprimento de onda da amostra a ser analisada. Em todas as análises, foi realizada a leitura da absorbância da microemulsão sem a amostra (branco) no comprimento de onda de 238 nm e descontada do sistema contendo a amostra, correlacionando a absorbância obtida com a curva de calibração previamente construída (Anexo A).

Tabela 5.2 – Solubilidade da DCTN nos diversos veículos testados

Veículo	Solubilidade DCTN (mg/mL)*
ME-A (O/A)	1,306 ± 0,048
ME-B (bicontínua)	12,024 ± 0,538
ME-C (A/O)	25,045 ± 0,141
ME-D (A/O)**	10,262 ± 0,423
ME-E (bicontínua)	10,967 ± 0,492
ME-F (A/O)	27,193 ± 0,368
IPM	4,176 ± 0,035
Miglyol	11,754 ± 0,588
Ácido oléico	5,427 ± 0,236
Propilenoglicol	4,774 ± 0,076
Tween 80	4,266 ± 0,304
Água	$5,03 \times 10^{-2} \pm 0,0048$

* Os valores correspondem à média de 3 experimentos (Solubilidade = média ± desvio-padrão)

** Isento de cotensoativo

A polaridade mediana da DCTN permitiu obter melhores resultados com os sistemas ME-C e ME-F, que são microemulsões do tipo A/O. Neste caso, a grande quantidade da fase oleosa contribuiu para a dissolução da molécula, que pode se encontrar dissolvida no meio dispersante (fase oleosa), bem como na camada interfacial de tensoativo. A ausência do cotensoativo (etanol) ocasionou significativa redução da solubilidade da DCTN no sistema

ME-D. A justificativa pode ser dada pela diminuição da fluidez da camada de tensoativo, em função da ausência do etanol (que solubiliza bem a DCTN), que tem como consequência a diminuição da capacidade de solubilização da camada interfacial.

A grande quantidade de água (60% em massa) na ME-A fez com que a DCTN apresentasse a menor solubilidade nesse sistema quando comparada com os demais sistemas microemulsionados testados, sendo mais baixa inclusive que a sua solubilidade nos componentes isolados da microemulsão. De fato, microemulsões do tipo O/A não são apropriadas para solubilizar moléculas com baixa polaridade. Entretanto, uma forma de se elevar a solubilidade da DCTN em microemulsões do tipo O/A seria aumentar a proporção de tensoativo/cotensoativo, permitindo assim a obtenção de gotículas com menores tamanhos e uma associação mais facilitada entre a camada interfacial e a molécula da DCTN. Para os sistemas bicontínuos (ME-B e ME-E) a DCTN apresentou solubilidade intermediária entre os sistemas do tipo A/O e O/A, porém equivalente à ME-D.

Quanto à solubilidade da DCTN nos componentes individuais, verificou-se maior solubilidade nos óleos e no Tween 80 que na água, como já era esperado, devido à polaridade mediana da molécula. Mesmo assim, sua solubilidade em todos os óleos foi inferior àquela verificada nas microemulsões do tipo A/O, o que comprova o grande poder de solubilização dos sistemas microemulsionados. Um resultado interessante foi a alta solubilidade da DCTN no Miglyol, superando em mais de duas vezes a dos outros óleos testados e se equivalendo às microemulsões bicontínuas e à ME-D. O grande volume molecular do Miglyol pode ser o responsável pelo alto poder solubilizante deste óleo semi-polar (NARANG *et al.*, 2007). Entretanto, a DCTN não foi encapsulada em nenhum sistema microemulsionado contendo Miglyol, pois todas as misturas testadas com este óleo geraram pequenas regiões de microemulsão.

Quanto à estabilidade dos sistemas microemulsionados, não se observou a quebra das microemulsões com o tempo. Também não se observou a precipitação da DCTN solubilizada nos sistemas ME-C e ME-D, nos quais a DCTN microemulsionada foi disponibilizada para testes farmacológicos, em um intervalo mínimo de três meses.

5.3.1.1 Solubilização nos sistemas auto-microemulsificantes

O produto natural bioativo *trans*-desidrocrotonina foi solubilizado satisfatoriamente no sistema auto-microemulsificante ME-G (solubilidade = $10,830 \pm 0,221$ mg/mL), que possui em sua composição o propilenoglicol como cotensoativo ao invés do etanol. O propilenoglicol (propan-1,2-diol) é um cotensoativo menos tóxico que o etanol, e por isso é largamente empregado em formulações farmacêuticas, chegando a atingir 55% em massa em formulações comerciais de uso oral, como na formulação Agenarase®, que contém o amprenavir como princípio ativo (STRICKLEY, 2004).

O alto poder solubilizante de um sistema microemulsionado deriva principalmente da solubilização na camada interfacial de tensoativo. Nesse contexto, a solubilização de um fármaco na camada interfacial afeta a microemulsão em nível microestrutural (por exemplo, o tamanho das gotículas), mas também é intensamente afetada pelas mudanças estruturais que porventura ocorrerem na microemulsão. Quando um sistema auto-microemulsificante é diluído com água, como observado no trato gastrointestinal, ocorre a inversão da curvatura da camada interfacial: as gotículas do tipo A/O se transformam em gotículas do tipo O/A. Durante este fenômeno, pode ocorrer a precipitação do fármaco solubilizado no sistema auto-microemulsificante, principalmente quando o sistema está próximo da capacidade máxima de solubilização do fármaco em questão. Isso porque, além da camada interfacial, a fase oleosa também desempenha um importante papel no poder solubilizante das microemulsões, uma vez que as moléculas do óleo penetram na camada interfacial de tensoativos, aumentando a hidrofobicidade desta e, assim, favorecendo a solubilização de fármacos lipofílicos.

Dessa forma, a precipitação de um fármaco a partir de um sistema auto-microemulsificante se deve a uma súbita diminuição da capacidade de solubilização da microemulsão, que pode ocorrer durante a diluição em água. Neste caso, a água interfere na curvatura da camada interfacial, principalmente em sistemas contendo cotensoativos, que podem migrar para a fase aquosa dispersante com a diluição. Assim, o processo de precipitação pode ser afetado pelas condições do trato gastrointestinal e pela atuação lipídica (NARANG *et al.*, 2007; PORTER *et al.*, 2004; GODDEERIS *et al.*, 2007; FATOUROS *et al.*, 2008).

A fim de se avaliar a possibilidade de precipitação da DCTN a partir do sistema auto-microemulsificante ME-G no que diz respeito à diluição com água, foram realizados dois experimentos de solubilidade. Em um deles partiu-se do sistema ME-G saturado com a DCTN

(na capacidade máxima de solubilização da DCTN, ou seja, na concentração de 10,8 mg/mL), e no outro partiu-se de uma concentração 3,0 mg/mL de DCTN incorporada no sistema ME-G. Ambos os sistemas foram diluídos duas vezes: três vezes a concentração original D0 (D1) e trinta vezes a concentração original (D2), e tiveram sua solubilidade testada nos sistemas diluídos D1 e D2 (Tabela 5.3).

Tabela 5.3 – Dados de solubilidade da DCTN no sistema ME-G após sucessivas diluições em água

Sistema (Diluição)	Concentração teórica (mg/mL)	Concentração obtida (mg/mL)	Concentração obtida/concentração teórica
ME-G D0 (original)	3,0	3,0	100,0%
	10,8	10,8	100,0%
ME-G D1 (3 vezes)	1,0	1,0	100,0%
	3,6	2,9	80,5%
ME-G D2 (30 vezes)	0,10	0,08	80,0%
	0,36	0,24	66,7%

Para o sistema não-saturado na concentração inicial de 3,0 mg/mL, cerca de 80% da DCTN permaneceu retida no sistema auto-microemulsificante após à diluição D2, correspondente à trinta vezes a concentração original. Este resultado já era esperado e reforça o uso do sistema ME-G na veiculação oral da DCTN, uma vez que não se observou precipitação considerável do produto natural na concentração testada. O propilenoglicol, presente na composição do sistema ME-G, é menos propenso à migração para a fase aquosa que o etanol, que é comumente utilizado como cotensoativo em sistemas auto-microemulsificantes, e pode ser o responsável pela baixa precipitação da DCTN, uma vez que a camada interfacial permaneceu praticamente intacta, no que diz respeito à sua hidrofobicidade.

No entanto, quando este experimento foi repetido na capacidade máxima de solubilização do sistema ME-G, observou-se a redução de cerca de 35% na solubilidade da DCTN no sistema diluído D2 (Tabela 5.3). Este fato pode ser atribuído à inversão da curvatura da camada interfacial, associado a mudanças microestruturais do local de solubilização da DCTN (NARANG *et al.*, 2007).

5.3.2 Solubilização de outros produtos bioativos de *Croton cajucara*

A *trans*-crotonina (CTN), outro clerodano isolado de *Croton cajucara*, teve sua solubilidade testada nos sistemas microemulsionados contendo IPM como fase oleosa e etanol como cotensoativo (sistemas ME-A a ME-C), bem como nos componentes Tween 80, IPM e água bidestilada (Tabela 5.4). A CTN apresentou solubilidade bastante inferior àquela observada para a DCTN. Porém, de maneira similar à DCTN, a solubilidade da CTN foi maior nos sistemas ricos em fase oleosa (ME-B e ME-C), devido à polaridade mediana desta molécula. Além disso, sua solubilidade nos sistemas microemulsionados foram superiores em comparação com seus componentes isolados, o que comprova a eficácia das microemulsões na solubilização deste importante produto natural.

Tabela 5.4 – Solubilidade da CTN nos diversos veículos testados

Veículo	Solubilidade CTN (mg/mL)*
ME-A	2,038 ± 0,115
ME-B	3,941 ± 0,080
ME-C	3,585 ± 0,065
IPM	2,613 ± 0,183
Tween 80	2,781 ± 0,396
Água	5,3 × 10 ⁻² ± 0,048

* Os valores correspondem à média de 3 experimentos (Solubilidade = média ± desvio-padrão)

Quanto ao triterpeno ácido acetilaleurítico (AAA), sua solubilidade foi testada em diversos sistemas microemulsionados, porém em nenhum deles a solubilidade foi superior a 1 mg/mL. O AAA apresenta propriedades biológicas significativas (MACIEL *et al.*, 2000), porém sua baixa solubilidade em praticamente todos os excipientes biológicos limita sua biodisponibilidade e, conseqüentemente, uma resposta farmacológica satisfatória. Estudos de RMN no estado sólido, DSC e de modelagem molecular confirmaram que a molécula de AAA apresenta-se sob a forma dimérica, com ligações de hidrogênio inter-moleculares,

diminuindo, assim, a ocorrência de formação de ligações de hidrogênio com a água, e consequentemente a sua solubilidade (SAN GIL *et al.*, 2008).

5.3.3 Solubilização de extratos vegetais

Extratos e frações obtidas de três diferentes espécies – *Croton cajucara*, *Anacardium occidentale* e *Phyllanthus amarus* – foram solubilizados nos sistemas microemulsionados ME-D e/ou ME-G para fins de realização de experimentos farmacológicos (Tabela 5.5). A escolha destes dois sistemas microemulsionados é devida à ausência de etanol, que pode ser um fator decisivo para a obtenção de bons resultados farmacológicos.

Tabela 5.5 – Solubilidade dos extratos vegetais nos sistemas microemulsionados testados

Extrato	Solubilidade extratos (mg/mL)*	
	ME-D	ME-G
CC-EHA	—	8,04 ± 0,56
CC-FA	8,35 ± 1,05	2,94 ± 1,05
AO-EM	8,12 ± 2,47	—
AO-FT	5,59 ± 1,35	—
PA-EE	50,97 ± 0,64	44,25 ± 1,12

* Os valores correspondem à média de 3 experimentos (Solubilidade = média ± desvio-padrão)

O extrato hidroalcoólico das cascas do caule de *Croton cajucara* (CC-EHA), bem como uma fração deste extrato rica em alcalóides (CC-FA) foram solubilizados no sistema ME-G. O extrato CC-EHA apresentou solubilidade satisfatória neste sistema, enquanto que a fração rica em alcalóides (CC-FA) apresentou maior solubilidade no sistema ME-D.

O sistema microemulsionado ME-D solubilizou satisfatoriamente o extrato metanólico de *Anacardium occidentale* (AO-EM) e a fração polar rica em taninos (AO-FT) obtida deste extrato. A menor solubilidade para AO-FT pode ser atribuída à elevada polaridade desta

fração, uma vez que o sistema microemulsionado utilizado (ME-D) é rico em fase oleosa e indicado para a solubilização de compostos lipofílicos.

O extrato etanólico de *Phyllanthus amarus* (PA-EE) foi o que apresentou o melhor resultado nos testes de solubilidade. Este extrato é rico em lignanas (KASSUYA *et al.*, 2006; KASSUYA *et al.*, 2003; MACIEL *et al.*, 2007), que são compostos com polaridade moderada, que podem ser facilmente solubilizados em sistemas microemulsionados ricos em fase oleosa.

5.3.4 Considerações gerais sobre os testes de solubilidade

Os sistemas microemulsionados testados solubilizaram satisfatoriamente o produto natural bioativo *trans*-desidrocrotonina (DCTN), em especial os sistemas ricos em fase oleosa devido à polaridade mediana deste diterpeno. Adicionalmente, todos os sistemas microemulsionados, à exceção do sistema ME-A, rico em fase aquosa, foram mais eficazes na solubilização da DCTN do que seus componentes isoladamente, atestando o alto poder de solubilização das microemulsões obtidas.

No entanto, não se observou a mesma capacidade de solubilização destes sistemas com a CTN, apesar de a única mudança estrutural entre a DCTN ser a hidrogenação da ligação dupla nos carbonos 3 e 4. Quanto ao triterpeno AAA, a sua solubilização nos sistemas microemulsionados obtidos não produziu resultados satisfatórios. Portanto, uma das alternativas remanescentes para a veiculação deste triterpeno é o seu encapsulamento em nano- e micro-esferas, em que o AAA pode vir a ser encapsulado sob a forma sólida (SANGIL *et al.*, 2008).

Os ensaios de diluição com o sistema auto-microemulsificante ME-G contendo a DCTN demonstraram que não ocorreu precipitação significativa do material solubilizado, quando se utiliza concentrações abaixo do ponto de saturação ou solubilidade máxima da microemulsão. Este resultado pode ser visto como uma garantia da não-ocorrência de precipitação do material microemulsionado em uma possível aplicação oral do sistema ME-G contendo a DCTN.

Os sistemas microemulsionados obtidos neste trabalho também foram úteis na solubilização de extratos de três diferentes espécies vegetais. À exceção do extrato etanólico de *Phyllanthus amarus* (PA-EE), os demais extratos tiveram solubilidade inferior àquela

encontrada para o produto isolado DCTN. A existência de uma gama de produtos naturais de diferentes polaridades pode ter sido o responsável por essa baixa solubilidade dos extratos comparada com a DCTN. Mesmo assim, estes extratos foram mais solúveis nos sistemas microemulsionados testados do que nos excipientes comumente utilizados, e dessa forma, permitiu que ensaios farmacológicos fossem realizados com tais extratos.

5.4 CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA

Os sistemas microemulsionados obtidos foram caracterizados quanto ao índice de refração, comportamento reológico, distribuição de tamanho das gotículas e condutividade elétrica. Os dados obtidos de índice de refração foram utilizados nas análises de tamanho das gotículas.

5.4.1 Reologia

A análise dos resultados de viscosidade e de índice de refração obtidos para os seis sistemas microemulsionados convencionais (ME-A a ME-F) indicou algumas características interessantes que podem inviabilizar ou respaldar a sua aplicação em uma determinada via de administração (Tabela 5.6). Adicionalmente, o comportamento reológico de microemulsões pode ser um indicativo do arranjo estrutural das gotículas no interior do sistema.

Tabela 5.6 – Dados de viscosidade e índice de refração dos sistemas microemulsionados

Sistema	Viscosidade (cp)*	Índice de refração
ME-A	11,25 ± 0,08	1,3723
ME-B	26,74 ± 0,08	1,4068
ME-C	15,81 ± 0,09	1,4178
ME-D	78,73 ± 0,08	1,4404
ME-E	28,85 ± 0,07	1,4122
ME-F	23,52 ± 0,07	1,4443

* Os valores correspondem à média de 100 pontos com período de rotação 1-150 s⁻¹

O sistema ME-A apresentou a menor viscosidade devido à maior quantidade de água presente (60% em massa) neste sistema. Ainda assim, sua viscosidade foi dez vezes superior ao valor da viscosidade da água pura a 25 °C. Este resultado pode ser atribuído à estrutura rígida, bem como ao baixo BHL (lipofilicidade) da mistura de tensoativo no sistema ME-A. Isto pode ser comprovado quando comparamos este sistema com o sistema rico em óleo, ME-C. Em comparação com ME-A, o sistema ME-C apresentou viscosidade pouco superior, apesar de apresentar grande quantidade de IPM, que apresenta viscosidade bem superior à água, demonstrando que a mistura de tensoativo Tween 80 : Span 20 (3:1) apresenta maior afinidade com o óleo (IPM). Em termos de aplicação farmacológica, pode-se inferir que o sistema ME-A não seria útil para aplicação parenteral. Para esta aplicação, faz-se necessário o uso de sistemas ricos em água, porém com baixa viscosidade. No entanto, o sistema ME-A pode ser aplicado em outras vias como a intranasal e intra-ocular, por exemplo.

Os sistemas ricos em fase oleosa, ME-C (45% de IPM) e ME-F (55% de ácido oléico), apresentaram alta viscosidade. No entanto, o sistema ME-F apresentou viscosidade superior devido principalmente à presença do ácido oléico, que é uma molécula hidrofóbica de cadeia longa e, portanto, com menor poder de penetração na camada interfacial de tensoativo que o IPM. A alta viscosidade desses sistemas, aliada ao caráter lipofílico da microemulsão do tipo A/O torna estes sistemas valiosos para aplicação transdérmica de fármacos.

Para o sistema ME-D, a ausência do cotensoativo etanol ocasionou aumento significativo da sua viscosidade. De fato, uma das funções do cotensoativo é aumentar a fluidez da camada interfacial de tensoativo. Sua ausência, portanto, acarreta em uma maior

rigidez dos domínios água-óleo formados, modificando a viscosidade do sistema, e a região de microemulsão (que diminui), como pode ser observado no diagrama de fases (Figura 5.2a, página 89).

Os sistemas ME-B e ME-E, que possuem quantidades equivalentes de água e óleo em sua composição, apresentaram a maior viscosidade dentre os sistemas que possuíam cotensoativo. Este resultado pode ser indicativo, mas não necessariamente conclusivo, da presença de estruturas bicontínuas no interior do sistema. Estruturas bicontínuas são caracterizadas por extensos domínios de óleo e água inter-conectados tridimensionalmente, e por isso, apresentam geralmente alta viscosidade (BOLZINGER-THEVENIN *et al.*, 1999).

Todos os sistemas microemulsionados convencionais apresentaram comportamento Newtoniano, ou seja, a taxa de cisalhamento foi proporcional à tensão aplicada, proporcionando, assim, uma viscosidade constante com o tempo dentro da faixa de tensão aplicada (Anexo B).

5.4.1.1 Reologia dos sistemas auto-microemulsificantes

Os sistemas auto-microemulsificantes também foram avaliados quanto ao seu comportamento reológico. Inicialmente, foram obtidas a viscosidade de ambos os sistemas (ME-G e ME-H) na sua forma original (D0), bem como nas diluições em um fator de 3 e em fator de 30 (D1 e D2, respectivamente) (Tabela 5.7). Como era de se esperar, os sistemas originais D0 apresentaram elevada viscosidade, devido à ausência (ou pequena quantidade) de água em sua composição inicial. No entanto, a viscosidade do sistema ME-G foi praticamente o dobro da observada para o sistema ME-H. Dois fatores contribuíram para este resultado: (i) o uso do etanol como cotensoativo no sistema ME-H, que conferiu maior fluidez à camada interfacial de tensoativo, e (ii) a presença do propilenoglicol como cotensoativo no sistema ME-G. O propilenoglicol, de fato, possui viscosidade acentuada quando comparado aos alcoóis simples, apresentando um aspecto oleoso. Apesar da alta viscosidade dos sistemas originais D0, ambos (ME-G e ME-H) apresentaram comportamento Newtoniano (Anexo B).

Tabela 5.7 – Dados de viscosidade e índice de refração dos sistemas auto-microemulsificantes

Sistema	Viscosidade (cp)*	Índice de refração
ME-G (D0)	145,72 ± 0,26	1,4471
ME-G (D1)	3,61 ± 0,09	1,3610
ME-G (D2)	1,18 ± 0,07	1,3349
ME-H (D0)	74,6 ± 0,23	1,4390
ME-H (D1)	3,67 ± 0,09	1,3586
ME-H (D2)	1,16 ± 0,06	1,3346

* Os valores correspondem à média de 100 pontos com período de rotação 1-150 s⁻¹

Quanto aos sistemas diluídos, pode-se observar que houve um decréscimo bastante significativo da viscosidade a partir da primeira diluição D1 (fator 3), que apresenta aproximadamente 75% em massa de água. Isto significa que os sistemas auto-microemulsificantes obtidos são bastante toleráveis à presença de água, ou seja, à diluição em água, principalmente quando se compara sua viscosidade com a do sistema microemulsionado convencional rico em água, ME-A (aproximadamente 11,25 cp). Esta capacidade de assimilação de moléculas de água no interior da microemulsão é uma característica fundamental dos sistemas auto-microemulsificantes. Na segunda diluição, D2, (com fator de diluição 30) a viscosidade do sistema ficou bastante próxima à viscosidade da água pura na temperatura analisada. Todos os sistemas diluídos, D1 e D2, tanto para o sistema ME-G quanto para ME-H, apresentaram comportamento Newtoniano (Anexo B).

Outro estudo foi realizado a fim de se determinar os tipos de microestruturas presentes no decorrer da diluição dos sistemas auto-microemulsificantes. No início da diluição, devido à pequena quantidade de água presente, as microestruturas observadas no sistema são do tipo A/O. Continuando a diluição, a quantidade de água aumenta até se observar a inversão das gotículas no interior da microemulsão para o tipo O/A. Entre essa inversão, ocorre a formação de estruturas bicontínuas ou cristais líquidos, que são caracterizadas por uma alta viscosidade (BOLZINGER-THEVENIN *et al.*, 1999). Assim, o perfil de viscosidade reflete as interações estruturais ocorridas no decorrer da diluição e não necessariamente os pontos nos quais as transições ocorrem. Para o sistema ME-G o pico máximo de viscosidade foi alcançado com a adição de 30% em massa de água, enquanto que para o sistema ME-H ele foi alcançado com

40% de água. (Figura 5.6). Neste pico, podemos garantir a existência de estruturas bicontínuas e/ou cristais líquidos (gel, estruturas cúbicas, cilíndricas, lamelares). Após o pico, a adição de mais água provoca o colapso das estruturas em forma de gel e a viscosidade diminui significativamente, sugerindo a formação de microestruturas do tipo O/A.

Como esperado, o sistema ME-G apresentou viscosidade superior ao sistema ME-H nas primeiras diluições. Entretanto, nas últimas diluições realizadas, um decréscimo acentuado da viscosidade do sistema ME-G foi observado. Isto significa que a inversão das gotículas do tipo A/O para O/A ocorre mais rapidamente no sistema ME-G, ou que a existência de estruturas bicontínuas é mais frequentemente observada no sistema ME-H. Além disso, o estudo reológico dessas diluições demonstrou que ambos os sistemas deixaram de ter um comportamento Newtoniano (Anexo B) em uma diluição intermediária (para ME-G: 20-40% de água; ME-H: 30-40%) para retornarem apenas nas últimas diluições (a partir de 50% para ME-G e ME-H) (Figura 5.6). Este comportamento não-Newtoniano é característico de estruturas lamelares e cristais líquidos (CHAN *et al.*, 2007; D'ANTONA *et al.*, 2000).

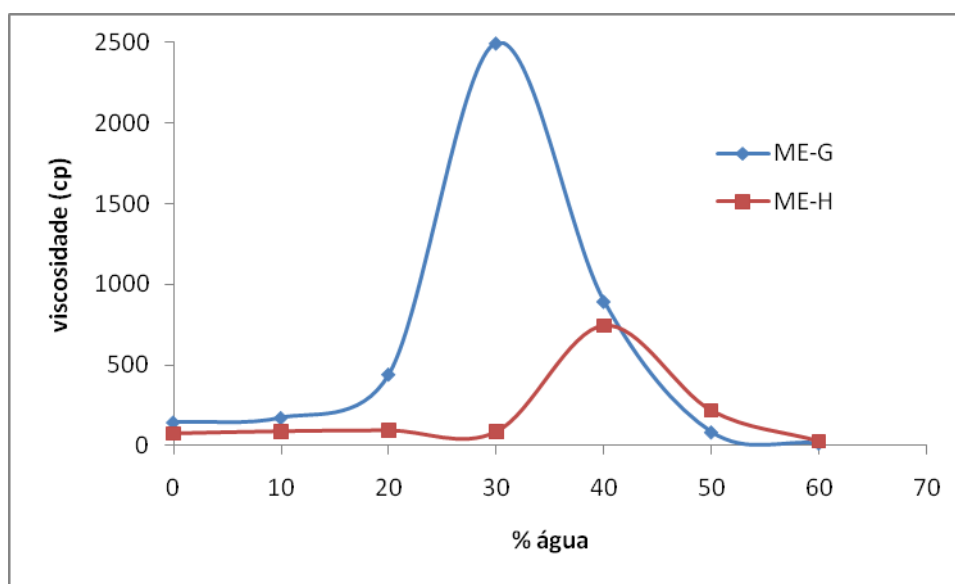


Figura 5.6 – Perfil de viscosidade dos sistemas auto-microemulsificantes no decorrer de uma diluição com água

5.4.2 Distribuição de tamanho das gotículas

O tamanho médio das gotículas nos sistemas microemulsionados convencionais (ME-A a ME-F) são mostrados na Tabela 5.8. À exceção do sistema ME-F, todas as outras microemulsões apresentaram diâmetro médio das gotículas inferior a 30 nm, dentro da faixa nanométrica. Adicionalmente, apresentaram também baixo índice de polidispersão, o que representa uma distribuição de tamanho mais uniforme. O resultado aparentemente discrepante para o sistema ME-F foi repetido em dois equipamentos diferentes, que apresentaram valores semelhantes. Este resultado pode ser demonstrativo de um sistema meta-estável, uma microemulsão que se encontra no limiar de se tornar uma emulsão. De fato, a adição de uma pequena quantidade de água (e.g. o volume de meia gota) ocasiona a quebra da microemulsão, transformando-a em um sistema emulsionado de aspecto turvo.

Tabela 5.8 – Dados de diâmetro das gotículas e índice de polidispersão dos sistemas microemulsionados

Sistema	Diâmetro (nm)*	Índice de Polidispersão
ME-A	29,2 ± 0,5	0,290 ± 0,005
ME-B	21,1 ± 0,1	0,253 ± 0,004
ME-C	22,6 ± 1,1	0,264 ± 0,014
ME-D	19,4 ± 0,3	0,212 ± 0,009
ME-E	11,7 ± 0,1	0,308 ± 0,002
ME-F	4604,2 ± 220,1	0,489 ± 0,012

* Os valores correspondem à média de 3 experimentos (média ± desvio-padrão)

O resultado mais elevado para o sistema ME-A, rico em fase aquosa, já era esperado, tendo em vista que foi utilizada uma mistura de tensoativos com baixo BHL. O alto caráter lipofílico dos tensoativos utilizados faz com que eles se auto-associem, em meio aquoso, com uma curvatura relativamente pequena, a fim de evitar ao máximo o contato de suas regiões hidrofóbicas com as moléculas de água, o que reflete em um maior diâmetro das gotículas de microemulsão do tipo O/A.

Os sistemas bicontínuos, ME-B e ME-E, apresentaram baixos valores para o diâmetro de suas partículas. Considerando que os sistemas bicontínuos são constituídos de extensas

regiões de óleo e água, tal resultado parece ser discrepante. Entretanto, a análise do tamanho de partículas utilizando técnicas de espalhamento de luz fornece resultados considerando sempre o formato esférico das partículas (ACHARYA *et al.*, 2001), limitando, assim, a utilização desta técnica para a obtenção do tamanho das gotículas em sistemas bicontínuos. Outro fator que aponta para a existência de sistemas bicontínuos é o alto índice de polidispersão. Apesar, de ter apresentado o menor tamanho de suas gotículas, o sistema ME-E também apresentou o maior índice de polidispersão (excetuando o sistema ME-F).

Também foi obtido o tamanho médio das gotículas do sistema ME-D contendo a DCTN. O tamanho médio observado foi de $20,5 \pm 0,1$ nm, com índice de polidispersão igual a 0,225. O aumento do tamanho das gotículas de microemulsão no sistema ME-D com a incorporação da DCTN evidencia a localização da molécula de DCTN na camada interfacial de tensoativos. A presença de moléculas de DCTN entre moléculas do tensoativo provoca a diminuição da curvatura da micela, e conseqüentemente, o aumento do tamanho das gotículas.

Por outro lado, a incorporação da DCTN no sistema ME-C provocou a diminuição do tamanho das gotículas ($18,1 \pm 0,3$ nm; índice de polidispersão = 0,233). Sabe-se que a adição de cotensoativos ocasiona a expansão da camada interfacial, e conseqüentemente, o aumento do tamanho das gotículas de microemulsão (PATEL e VAVIA, 2007), o que explica, por exemplo, o menor tamanho das gotículas de microemulsão do tipo A/O no sistema ME-D, isento de etanol, comparado com o sistema ME-C, ambos sem o fármaco incorporado. A incorporação da DCTN nos sistemas microemulsionados compete com o etanol pela localização na camada interfacial. A DCTN incorporada expulsa moléculas de etanol da camada interfacial. Como a DCTN é uma molécula de tamanho médio, a expulsão de moléculas do cotensoativo no filme interfacial tem um efeito mais pronunciado (diminuição do tamanho) que o aumento de tamanho ocasionado pela incorporação das moléculas de DCTN.

O tamanho médio das gotículas nos sistemas auto-microemulsificantes (ME-G e ME-H) também foi avaliado em função da diluição em água. Nesse contexto, foi analisado o tamanho médio das gotículas nos sistemas originais (D0) e em dois sistemas diluídos (D1 e D2). Para o sistema ME-G não foi observado qualquer influência da adição de água no tamanho das gotículas (aproximadamente 60 nm) (Tabela 5.9). No entanto, para o sistema ME-H observou-se um comportamento anômalo para o tamanho médio das gotículas, o que pode ocasionar problemas de liberação e/ou precipitação do fármaco antes de alcançar o estômago, causados principalmente pela migração do etanol da camada interfacial para a fase aquosa dispersante, justificando as mudanças microestruturais observadas (NARANG *et al.*, 2007).

Tabela 5.9 – Dados de diâmetro das gotículas e índice de polidispersão dos sistemas auto-microemulsificantes

Sistema	Diâmetro (nm)*	Índice de Polidispersão
ME G (D0)	32,5 ± 0,5	0,361 ± 0,008
ME G (D1)	61,7 ± 0,5	0,274 ± 0,002
ME G (D2)	59,6 ± 0,6	0,120 ± 0,012
ME H (D0)	41,7 ± 4,4	0,371 ± 0,006
ME H (D1)	85,1 ± 1,3	0,328 ± 0,003
ME H (D2)	23,1 ± 0,2	0,076 ± 0,008

* Os valores correspondem à média de 3 experimentos (média ± desvio-padrão)

5.4.3 Condutividade elétrica

Medidas de condutividade elétrica podem ser empregadas para monitorar mudanças estruturais nas microemulsões no decorrer de uma diluição. Um gráfico de condutividade versus fração de água apresenta tipicamente um formato de sino, onde é possível distinguir três importantes regiões (PODLOGAR *et al.*, 2004; PODLOGAR *et al.*, 2005) (Figura 5.7). Inicialmente, observa-se pequeno acréscimo da condutividade com a adição de água ($\Phi_w < 12\%$ para o sistema ME-G; e $\Phi_w < 20\%$ para o ME-H). Neste intervalo são encontradas gotículas do tipo A/O, que estão isoladas uma das outras. Quando a fração de água (Φ_w) alcança e excede um valor crítico conhecido como limiar de percolação (Φ_p), as gotículas começam a interagir umas com as outras, formando gotículas maiores além de canais com muitos caminhos de condutividade, provocando um aumento significativo da condutividade (k). O limiar de percolação (Φ_p) pode ser estimado com maior precisão a partir do gráfico ($dk/d\Phi_w$) em função da fração de água (Φ_w) (PODLOGAR *et al.*, 2004; PODLOGAR *et al.*, 2005) (Figura 5.8). O pico máximo desse gráfico corresponde ao Φ_p e pode ser encontrado entre 20-30% de água para o sistema ME-G, e entre 30-40% para o sistema ME-H. Assim, a transição de gotículas do tipo A/O para a fase bicontínua ocorre nesse intervalo. A região da fase bicontínua é relativamente ampla, compreendendo o intervalo $20-30 < \Phi_w < 55\%$ para ambos os sistemas, onde a curva perde a sua linearidade. Com a adição de mais água, a

condutividade decai um pouco, sugerindo a ocorrência do processo de transformação da fase bicontínua em gotículas do tipo O/A, onde a fase aquosa torna-se a fase contínua.

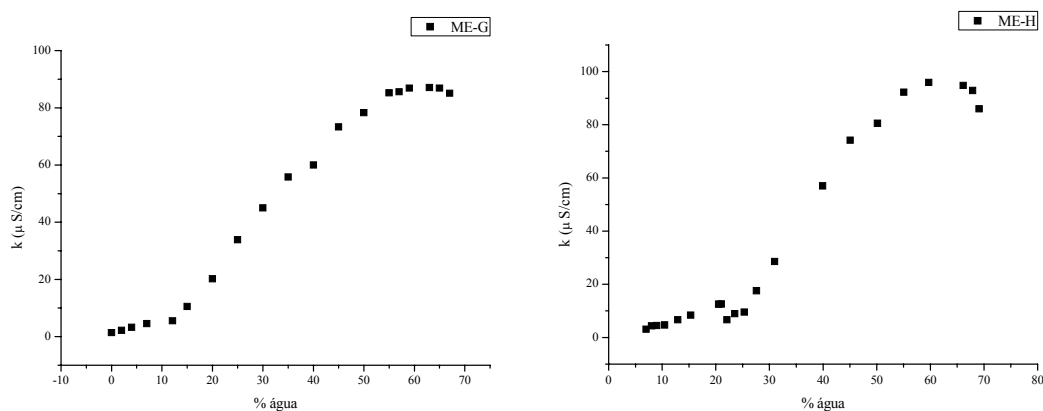


Figura 5.7 – Gráficos de condutividade elétrica em função da composição de água nos sistemas auto-microemulsificantes ME-G (a) e ME-H (b).

A análise das mudanças estruturais nos sistemas auto-microemulsificantes feita a partir dos dados de condutividade corroboraram com os resultados de viscosidade. A região de fase bicontínua ou cristais líquidos inicia-se entre 20-30% e se estende por volta de 50-60% de água, e é caracterizada por um aumento significativo da condutividade (Figura 5.7) e da viscosidade (Figura 5.6). Antes e após essa região temos, respectivamente, microestruturas do tipo A/O e O/A.

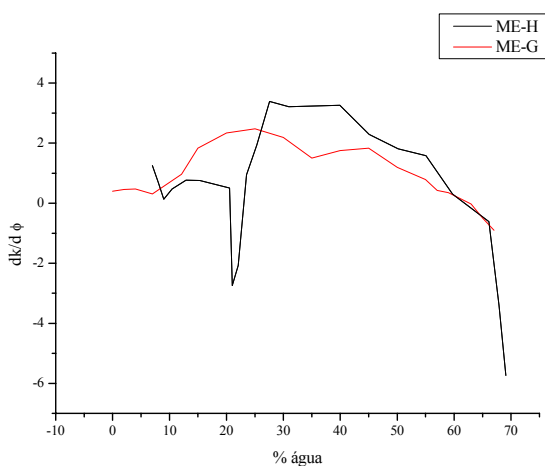


Figura 5.8 – Gráfico da primeira derivada $dk/d\Phi_w$ em função da composição de água

5.4.4 Considerações gerais sobre a caracterização físico-química

Os ensaios de caracterização físico-química permitiram confirmar o tamanho nanométrico das microemulsões obtidas e, principalmente, estimar o tipo de microestrutura presente em cada sistema microemulsionado convencional (ME-A a ME-F). Desta forma, os resultados de distribuição de tamanho sugerem que o sistema ME-F, apesar de ser unifásico e límpido, pode não se constituir em uma microemulsão. Além disso, os dados de viscosidade obtidos também permitiram viabilizar ou restringir cada sistema microemulsionado para aplicação em determinada via de administração (parenteral, oral, transdérmica, etc.).

Quanto aos sistemas auto-microemulsificantes, observou-se concordância dos resultados de viscosidade e condutividade com relação às transições de microestruturas observadas no decorrer da diluição em água. A inversão das gotículas A/O para O/A ocorre mais cedo para o sistema ME-G. O sistema ME-H apresentou extensa região de cristais líquidos e/ou fase bicontínua, mesmo em altas composições de fase aquosa.

5.5 AVALIAÇÃO DAS PROPRIEDADES ANTIOXIDANTE E BACTERIOSTÁTICA

Produtos naturais bioativos e extratos obtidos de diversas espécies vegetais apresentam valiosas propriedades biológicas. Extratos e frações, apesar de conterem uma variedade de substâncias, podem apresentar um ou mais princípios ativos responsável(is) por determinada propriedade farmacológica da planta. Dessa forma, podem-se reduzir custos e trabalho com o isolamento de um produto natural bioativo, utilizando-se extratos e frações, contendo este produto em quantidade apreciável, sem perda significativa de suas propriedades biológicas.

No entanto, a utilização de extratos vegetais pode recair no mesmo problema frequentemente observado para produtos naturais isolados: a baixa solubilidade nos excipientes convencionais. Nesse contexto, os sistemas microemulsionados podem se tornar valiosos instrumentos para a biodisponibilização desses extratos, bem como para diminuição da sua dose-resposta.

Neste trabalho foi avaliada a propriedade antioxidante de extratos de diferentes espécies vegetais, bem como a atividade bacteriostática de um extrato de *Croton cajucara*. Em todos os ensaios farmacológicos, os extratos foram solubilizados em microemulsões, a fim de se avaliar a eficácia desses sistemas como veículos farmacológicos.

5.5.1 Propriedade antioxidante

A propriedade antioxidante de extratos ou frações das espécies vegetais *Croton cajucara*, *Anacardium occidentale* e *Phyllanthus amarus* foi avaliada frente ao radical DPPH. Sistemas microemulsionados foram utilizados para aumentar a solubilidade dos materiais testados com perspectiva de aumento da sua ação antioxidante. Em alguns casos, foi avaliada a ação antioxidante de extratos na sua forma bruta e solubilizados em sistemas microemulsionados, a fim de atestar a importância desses sistemas na veiculação de fármacos e extratos vegetais.

5.5.1.1 Extratos de *Croton cajucara* solubilizados em microemulsões

Os sistemas microemulsionados obtidos neste trabalho mostraram-se eficazes no processo de solubilização dos extratos de diversas polaridades obtidos das folhas da espécie *Croton cajucara*. O sistema ME-A (rico em fase aquosa) foi o que melhor solubilizou o extrato metanólico (CC-EM), devido, principalmente, à alta polaridade deste extrato. Ambos os sistemas ME-C e ME-D solubilizaram bem o extrato hexânico (CC-EH). Para o extrato clorofórmico (CC-EC), o sistema contendo o cotensoativo (ME-C) foi o mais eficaz (GOMES *et al.*, 2007).

Os resultados antioxidativos obtidos com os extratos testados (CC-EH, CC-EC e CC-EM) mostraram que as folhas de *Croton cajucara* apresentam propriedade antioxidante. A atividade antioxidante foi expressa em valores de $CE_{50} \pm$ desvio-padrão (Tabela 5.10), obtidos através do gráfico que relaciona o percentual de atividade antioxidante (%AA) com a concentração de cada extrato testado.

Tabela 5.10 – Valores de CE_{50} obtidos para os extratos CC-EH, CC-EC e CC-EM solubilizados em sistemas microemulsionados

Extrato	CE_{50} (mg/mL)*
CC-EH em ME-C	413,00 \pm 11,07
CC-EH em ME-D	446,07 \pm 52,22
CC-EC em ME-C	279,96 \pm 38,26
CC-EC em ME-D	362,63 \pm 15,27
CC-EM em ME-A	348,05 \pm 3,70
CC-EM em ME-D	321,83 \pm 22,10

* Os valores correspondem à média de 3 experimentos

Os extratos de maior polaridade (CC-EC e CC-EM) apresentaram os melhores resultados antioxidantes, que pode ser justificado pela maior concentração dos flavonóides 3,7,4'-tri-*O*-metilcanferol e 3,7-di-*O*-metilcanferol, que são compostos polares presentes nesses extratos (MACIEL *et al.*, 2009).

Adicionalmente, pôde-se verificar, que em relação aos sistemas microemulsionados testados, não se observou interferência significativa na atividade avaliada, à exceção do extrato clorofórmico, CC-EC, que apresentou maior atividade antioxidante quando solubilizado no sistema ME-C, que pode ser justificado pela baixa solubilidade deste extrato no sistema ME-D.

5.5.1.2 Extratos de *Anacardium occidentale* solubilizados em microemulsões

Foram avaliados o extrato metanólico bruto (AO-EM) obtido das cascas de *Anacardium occidentale*, bem como uma fração apolar correspondente ao óleo fixo (AO-FO) deste extrato e outra fração muito polar, rica em taninos (AO-FT) (GOMES *et al.*, 2006). Devido à sua baixa solubilidade em excipientes comumente utilizados, a fração AO-FT foi solubilizada em sistemas microemulsionados. Deste modo, pôde-se avaliar também a influência das microemulsões na atividade antioxidante e, igualmente, atestar a sua importância como veículos de fármacos.

Os resultados da avaliação da ação antioxidante mostraram-se bastante positivos, particularmente para o extrato metanólico bruto (AO-EM) e para a fração rica em taninos (AO-FT) (Tabela 5.11) (GOMES *et al.*, 2006). No entanto, a fração correspondente ao óleo fixo (AO-FO) não apresentou atividade até a dose de 710 µg/mL. De acordo com o esperado, estes resultados indicam que a atividade antioxidante de AO-EM decorre provavelmente da fração AO-FT rica em taninos (CHANWITHEESUK *et al.*, 2005). Em relação aos sistemas microemulsionados testados, ME-A e ME-D, não se observou interferência significativa na atividade avaliada.

Apesar do caráter polar da fração AO-FT, ambas as formulações testadas (ME-A e ME-D) solubilizaram parcialmente esta fração. Apesar disso, foram significativamente eficazes na avaliação da ação antioxidante de *Anacardium occidentale*, já que possibilitaram a biodisponibilização dos taninos. Uma vez que a ação antioxidante de AO-FT foi comparável ao do extrato bruto (AO-EM), o poder antioxidante de *Anacardium occidentale* foi atribuído à presença de taninos, contidos nesta fração. Outros sistemas microemulsionados não foram avaliados, pois não foram mais eficazes na solubilização de AO-FT (GOMES *et al.*, 2006).

Tabela 5.11 – Valores de CE_{50} obtidos para os extratos e frações de *Anacardium occidentale*

Extrato	CE_{50} ($\mu\text{g/mL}$)*
AO-EM bruto	42,47 \pm 0,14
AO-FT em ME-A	39,27 \pm 1,07
AO-FT em ME-D	42,20 \pm 5,20
AO-FO	N/A

* Os valores correspondem à média de 3 experimentos

5.5.1.3 Extratos de *Phyllanthus amarus* solubilizados em microemulsões

O extrato metanólico de *Phyllanthus amarus* (PA-EM) e suas formulações microemulsionadas tiveram sua ação antioxidante avaliada frente ao radical DPPH (Tabela 5.12). Observou-se aumento efetivo da propriedade antioxidante quando o extrato PA-EM foi microemulsionado. De fato, a utilização de um sistema microemulsionado aumentou a capacidade do material solubilizado, prevenindo a sua precipitação durante o experimento e, como consequência, praticamente dobrando a sua ação antioxidante.

Tabela 5.12 – Valores de CE_{50} obtidos para o extrato metanólico de *Phyllanthus amarus*

Extrato	CE_{50} ($\mu\text{g/mL}$)*
PA-EM bruto	46,67 \pm 1,12
PA-EM em ME-A	18,33 \pm 0,75
PA-EM em ME-D	22,96 \pm 1,29

* Os valores correspondem à média de 3 experimentos

O sistema ME-A, do tipo O/A, foi mais eficaz que o sistema ME-D (A/O), rico em fase oleosa, devido ao caráter polar do extrato avaliado. Microemulsões do tipo O/A são mais eficazes na veiculação de compostos polares, como as lignanas e compostos fenólicos

presentes na espécie *Phyllanthus amarus*, que são provavelmente responsáveis pela sua ação antioxidante (MACIEL *et al.*, 2007).

5.5.2 Atividade bacteriostática

O extrato hidroalcoólico obtido das cascas do caule de *Croton cajucara* (CC-EHA), solubilizado no sistema auto-microemulsificante ME-G, teve sua ação bacteriostática avaliada frente a bactérias gram-negativa *Escherichia coli* e gram-positivas *Bacillus cereus*. Ambas as linhagens utilizadas apresentaram-se sensíveis ao extrato CC-EHA em ME-G, tendo sido observado efeito dose-dependente nas concentrações testadas (0,1; 0,5 e 1,0 mg/mL) (Figura 5.9).

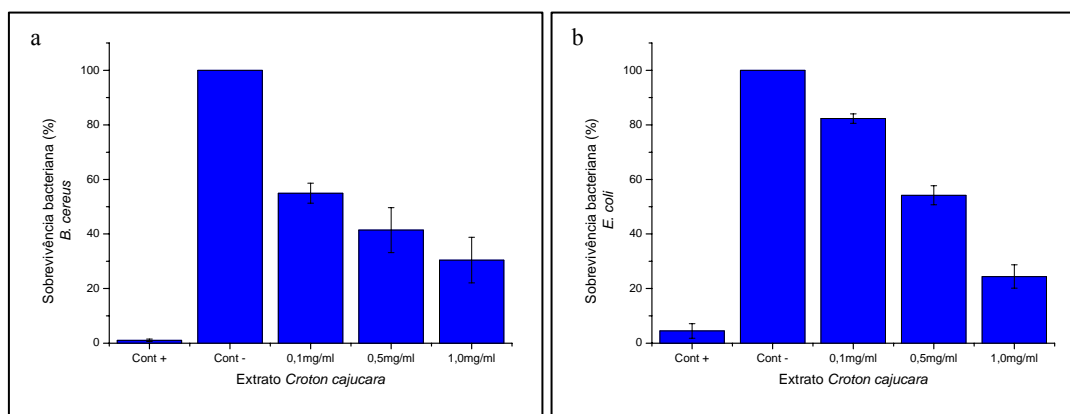


Figura 5.9 – Percentual de sobrevivência de colônias da (a) bactéria gram-positiva *B. cereus* e (b) bactéria gram-negativa *E. coli* em meio de cultura LB contendo diferentes concentrações do extrato CC-EHA após 24 h de incubação. Cont+ = controle positivo (ampicilina : cloranfenicol, 4:1). Cont- = controle negativo

Comparativamente, o efeito inibitório mais significativo foi observado frente à bactéria gram-positiva *B. cereus* (Figura 5.9a), e pode estar correlacionada com diferenças na estrutura molecular, especialmente na membrana celular, entre os indivíduos destes dois grupos de gram. Este efeito bactericida pode estar correlacionado com a presença de clerodanos (*trans*-desidrocrotonina, dentre outros) (MACIEL *et al.*, 2000), bem como com os constituintes apolares presentes no óleo fixo do extrato CC-EHA (SOUZA *et al.*, 2006).

O extrato CC-EHA apresenta baixa solubilidade aquosa, limitando seu uso oral e parenteral. Nos ensaios bactericidas foi utilizado o sistema auto-microemulsificante ME-G para a solubilização deste extrato, permitindo assim a avaliação de sua atividade

bacteriostática. O uso deste tipo de microemulsão ao invés dos sistemas microemulsionados convencionais (ME-A a ME-F) foi de extrema importância neste tipo de ensaio biológico, visto que nele ocorrem diluições em meio essencialmente aquoso, o que provocaria a quebra das microemulsões se não fosse utilizado um sistema auto-microemulsificante. O sistema ME-H, também um sistema auto-microemulsificante, não foi utilizado por conter etanol em sua composição, um solvente que apresenta propriedades citotóxicas que poderia interferir nos resultados obtidos. No entanto, mesmo com o uso do sistema ME-G, isento de etanol, observou-se efeito bactericida moderado da microemulsão testada.

5.5.3 Considerações gerais sobre os ensaios antioxidantes e bacteriostáticos

A atividade antioxidante está correlacionada com a presença de certas classes de compostos que possuem a propriedade de neutralizar a ação do oxigênio radicalar. Plantas de diversas espécies vegetais contêm substâncias antioxidantes e são empregadas no combate a doenças cuja etiologia é o estresse oxidativo. Entretanto, certos compostos e extratos dessas plantas apresentam baixa solubilidade nos excipientes mais utilizados, podendo ocasionar sua precipitação e diminuição da atividade antioxidante. Neste sentido, as microemulsões podem atuar na solubilização de agentes antioxidantes, prevenindo a sua precipitação e, conseqüentemente, contribuindo eficazmente para a biodisponibilidade do fármaco e, em alguns casos, ampliando sua ação biológica. Como exemplo, destacam-se os experimentos envolvendo extratos de *Croton cajucara*, que tiveram sua atividade antioxidante diretamente proporcional à sua solubilidade em sistemas microemulsionados.

As microemulsões obtidas neste trabalho foram, ainda, imprescindíveis para a realização de ensaios que avaliaram a propriedade antioxidante de uma fração polar, insolúvel em solventes biológicos, obtida de *Anacardium occidentale* (AO-FT). Dessa forma, pôde-se atribuir à classe de compostos dos taninos a responsabilidade por grande parte da ação antioxidante do extrato metanólico desta planta. Os resultados antioxidativos obtidos com as microemulsões utilizadas, bem como com os extratos e frações solubilizados nestes sistemas microemulsionados, demonstraram que as formulações não interferem nos resultados e foram eficazes na solubilização dos materiais vegetais, reforçando, portanto, a utilização de nanossistemas do tipo microemulsão como veículos de fármacos e extratos.

Do mesmo modo, a solubilização de CC-EHA em um sistema auto-microemulsificante farmacologicamente aceitável possibilitou a avaliação do efeito bacteriostático deste extrato, já que se trata de um extrato polar com baixa solubilidade nos solventes biológicos comumente utilizados. No entanto, neste caso, houve interferência do sistema utilizado, tendo sido evidenciado efeito bactericida moderado da microemulsão testada (ME-G) frente às bactérias estudadas.

Os testes de avaliação das propriedades antioxidante e bacteriostática foram realizados *in vitro*. Para o clerodano DCTN, sabe-se que a dosagem utilizada na avaliação *in vivo* de diversas propriedades biológicas foi, na maioria dos casos, superior a 25 mg do produto natural para cada kg do animal. Como exemplos: propriedade hipoglicêmica (25 e 50 mg/kg, via oral), hipolipidêmica (50 mg/kg, via oral), antiulcerogênica (100 mg/kg, via oral), antiinflamatória (50 e 200 mg/kg, via intraperitoneal), antinociceptiva (10, 20, 50 e 100 mg/kg, via oral), antiestrogênica (25 e 50 mg/kg, via oral), cardiovascular (10 e 15 mg/kg), antitumoral contra o carcinoma de Ehrlich (120 mg/kg, via intraperitoneal) (COSTA *et al.*, 2007).

Comparativamente, pode-se dizer que os sistemas que apresentaram maior capacidade de solubilização da DCTN foram aqueles do tipo A/O com a presença de etanol como cotensoativo (cerca de 25 mg/mL). Neste contexto, para realização de ensaios *in vivo* utilizando a DCTN incorporada nos sistemas microemulsionados avaliados, os experimentos mais viáveis são as atividades antinociceptiva, hipoglicêmica e cardiovascular. Para os demais experimentos, faz-se necessário a utilização de um volume maior de microemulsão para atingir a concentração utilizada nos testes *in vivo* que foram previamente realizados com a DCTN livre. Portanto, estudos toxicológicos das formulações obtidas neste trabalho, correlacionando doseamento e composição das microemulsões, estão sendo realizados para avaliar a possibilidade de veiculação segura deste protótipo de fármaco nestas formulações.

5.6 SIMULAÇÃO MD DE MICELAS DE C₁₂N-LACTITOL E C₁₂N-LACTOSIL

Sistemas micelares contendo tensoativos à base de açúcares, como C₁₂N-lactitol e C₁₂N-lactosil, podem se constituir em uma excelente opção como veículos para fármacos. Estudos computacionais podem ser empregados para a otimização desses sistemas a partir da compreensão do processo de micelização.

A concentração abaixo de 50%, soluções de $C_{12}N$ -lactitol apresentam uma fase isotrópica micelar (I_w) (AUVRAY *et al.*, 1995). Em concentrações próximas de 0,1M, são observados sistemas micelares contendo cerca de 88 monômeros (DUPUY *et al.*, 1996; DUPUY *et al.*, 1998). Dados experimentais referentes ao $C_{12}N$ -lactosil não foram encontrados na literatura. Adicionalmente, cerca de 5% das moléculas de $C_{12}N$ -lactitol encontram-se sob a forma ionizada em soluções aquosas com pH 9-10 (DUPUY *et al.*, 1996). Para as moléculas de $C_{12}N$ -lactosil espera-se que esta porcentagem seja ainda menor, devido ao impedimento estérico do grupo amino na configuração cíclica. Dessa forma, as simulações foram realizadas com um alto grau de solvatação (cerca de 17.000 moléculas de água ou 0,25 M), com número de agregação 88 para ambos os sistemas, e com todas as moléculas de tensoativo na forma não-ionizada. As simulações MD foram realizadas em um intervalo de tempo de 10 ns no ensemble NpT , porém os primeiros 500 ps foram tomados como etapa para equilíbrio. As propriedades calculadas neste trabalho foram computadas utilizando o tempo total de produção de 9,5 ns ou, em alguns casos, dos últimos 5 ns. As cargas parciais atômicas, para cada um dos monômeros (Figura 5.10), foram calculadas a partir do nível HF/6-31G*, sendo posteriormente utilizadas no algoritmo RESP (Tabela 5.13).

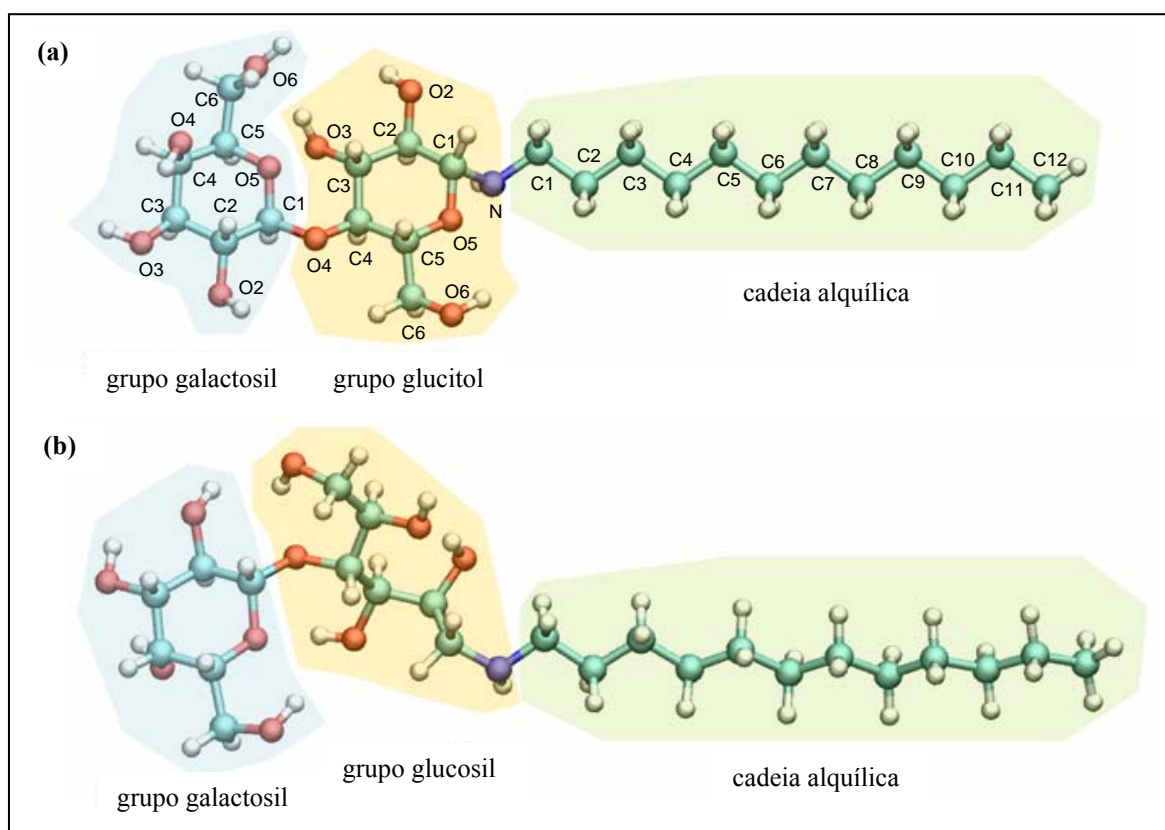


Figura 5.10 – Representação esquemática dos monômeros (a) $C_{12}N$ -lactosil e (b) $C_{12}N$ -lactitol. São mostrados os átomos de oxigênio (vermelho), carbono (ciano), nitrogênio (azul) e hidrogênio (branco) das moléculas de tensoativo

Tabela 5.13 – Cargas parciais atômicas das moléculas de C₁₂N-lactitol e C₁₂N-lactosil usadas nas simulações MD

Tipo de átomo (ver Figura 3.1)	Cargas parciais	
	C ₁₂ N-lactitol	C ₁₂ N-lactosyl
<i>Cadeia alquílica</i>		
N	-0.39	-0.52
C1-C10	0.00 to 0.02	0.01 to 0.03
C11	0.04	0.05
C12	-0.06	-0.07
H(N)	0.23	0.30
H(C1)	0.04	0.06
Outros hidrogênios	-0.01 to 0.01	-0.01 to 0.01
<i>Grupo glucosil (glucitol)</i>		
C1, C3	0.00 to 0.03	0.00 to 0.03
C2	0.09	-0.01
C4	-0.06	-0.03
C5	0.00	0.11
C6	0.06	0.06
O2, O3, O6	-0.63 to -0.53	-0.63 to -0.53
O4	-0.31	-0.30
O5	-0.57	-0.25
HO2, HO3, HO5 [†] , HO6	0.38 to 0.43	0.38 to 0.40
Outros hidrogênios	0.01 to 0.15	0.11 to 0.18
<i>Grupo galactosil</i>		
C1, C5	-0.02	-0.04 to -0.01
C2, C3, C4	0.02 to 0.04	0.01 to 0.04
C6	0.04	0.09
O2, O3, O4, O6	-0.63 to -0.60	-0.65 to -0.60
O5	-0.14	-0.05
HO2, HO3, HO4, HO6	0.37 to 0.46	0.36 to 0.48
Outros hidrogênios	0.10 to 0.18	0.09 to 0.15

[†]Apenas para C₁₂N-lactitol

5.6.1 Estabilidade e tamanho dos sistemas micelares

Apesar dos agregados micelares estarem em equilíbrio dinâmico em sistemas aquosos e as trocas monômero-micela ocorrerem na escala de tempo de aproximadamente 10^{-5} s (FENDLER e FENDLER, 1975), em ambos os sistemas as micelas permaneceram estáveis e eventos de escape de monômeros não foram observados no decorrer dos 10 ns de simulação. Entretanto, foi observado eventos de escape de monômeros da célula periódica, conforme esperado (KONIDALA *et al.*, 2006; CHONG *et al.*, 2006). Além disso, protusões na superfície micelar foram claramente observadas a partir dos *snapshots* obtidos ao longo da simulação (Figura 5.11). No decorrer da simulação, ambas as micelas perderam seu formato esférico inicial para adotar uma conformação onde regiões específicas da cauda hidrofóbica e da cabeça polar da superfície da micela estavam altamente expostas ao solvente.

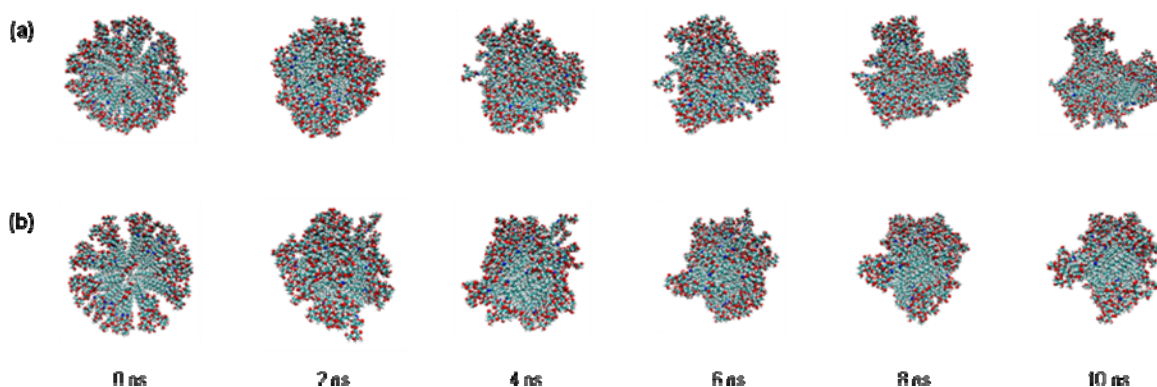


Figura 5.11 – Snapshots dos agregados micelares (a) C₁₂N-lactitol e (b) C₁₂N-lactosil no decorrer de 10 ns de simulação MD. São mostrados os átomos de oxigênio (vermelho), carbono (ciano), nitrogênio (azul) e hidrogênio (branco) das moléculas de tensoativo, enquanto que as moléculas de água foram omitidas por motivos de clareza

O raio de giro (R_g) foi calculado sobre o tempo de simulação de 9,5 ns. O gráfico de R_g em função do tempo para C₁₂N-lactitol mostrou uma curva ligeiramente ascendente, cujo valor médio de R_g encontrado para este sistema foi 22,06 Å (Figura 5.12). Este valor está de acordo com o valor experimental de 23,23 Å calculado a partir de técnicas de SANS e SAXS obtidos de um sistema micelar no formato elipsóide oblato contendo 88 moléculas de C₁₂N-lactitol a 24 °C (DUPUY *et al.*, 1996; DUPUY *et al.*, 1998). O valor médio de R_g encontrado para C₁₂N-lactosil foi 21,43 Å, e permaneceu constante durante o tempo de simulação, indicando estabilização deste sistema micelar. O valor superior de R_g encontrado para o

sistema contendo C₁₂N-lactitol em comparação com o C₁₂N-lactosil pode estar relacionado à grande flexibilidade do resíduo acíclico (glucitol) presente no composto alditol. Assim, os graus de liberdade rotacionais do resíduo glucitol permitem a observação de múltiplas conformações da cabeça polar no interior da camada hidrofílica.

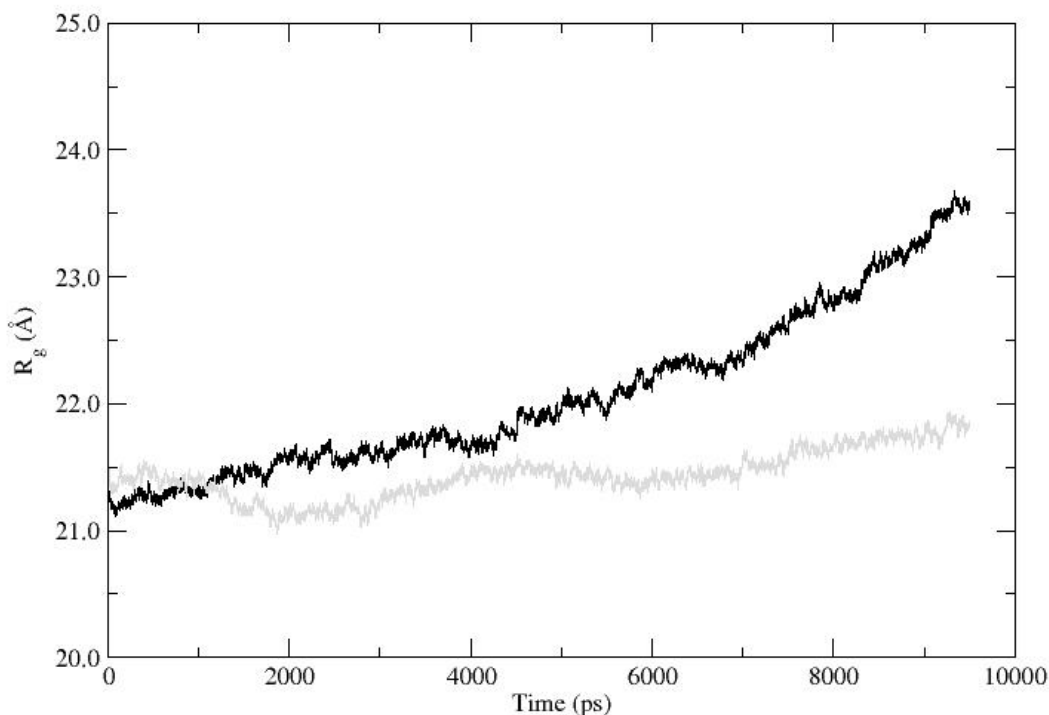


Figura 5.12 – Raio de giro, R_g , de micelas formadas por C₁₂N-lactitol (preto) e C₁₂N-lactosil (cinza) no decorrer de 9,5 ns de simulação MD

5.6.2 Área Superficial Acessível ao Solvente (SASA)

A avaliação das regiões hidrofóbicas e hidrofílicas do sistema micelar expostas ao solvente foram computadas sobre os últimos 9,5 ns de trajetória (Figura 5.13), usando o método desenvolvido por LEE e RICHARDS (1971). A contribuição da cadeia alquílica de ambos os sistemas ao valor total de SASA foi similar e apresentou-se constante durante a simulação, com valores médios de 3.655 Å² e 3.537 Å² para C₁₂N-lactitol e C₁₂N-lactosil, respectivamente. Comparada com o valor total de SASA (21.567 Å² para C₁₂N-lactitol, e 22.108 Å² para C₁₂N-lactosil), a contribuição da parte hidrofóbica é pequena (menos que

17%), indicando que as cadeias alquílicas estão apontadas para o centro da micela, evitando ao máximo o contato com o solvente. A contribuição da cabeça polar ao valor total de SASA foi dividida entre os dois grupos açúcar. Apesar de ambos os tensoativos conterem o mesmo grupo externo galactosil, a contribuição deste grupo para o SASA foi notadamente diferente (10.780 \AA^2 para o grupo galactosil em $C_{12}N$ -lactitol, e 13.076 \AA^2 em $C_{12}N$ -lactosil). Entretanto, esta diferença foi compensada pelo grupo sacarídeo ligado à cadeia alquílica, glucitol para $C_{12}N$ -lactitol (7.132 \AA^2) e β -glucosil para $C_{12}N$ -lactosil (5.495 \AA^2).

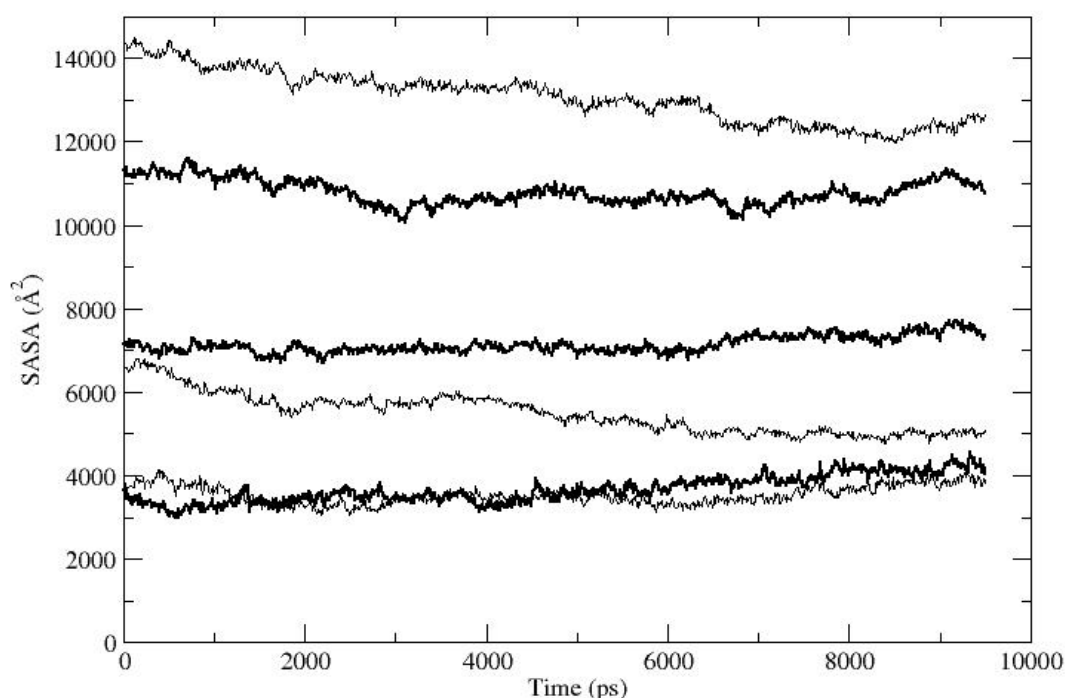


Figura 5.13 – Área Superficial Acessível ao Solvente (SASA) de micelas contendo moléculas de $C_{12}N$ -lactitol (negrito) e $C_{12}N$ -lactosil no decorrer de 9,5 ns de simulação MD. São mostradas as áreas superficiais expostas das cadeias alquílicas (inferior), e dos grupos glucosil/glucitol (meio) e galactosil (superior)

No processo de micelização, é esperado que a área superficial acessível da cauda hidrofóbica diminua consideravelmente devido à agregação das moléculas de tensoativos exposta à água (TANFORD, 1980). Em contrapartida, apenas mudanças sutis são frequentemente observadas na área superficial acessível das cabeças polares (LAH *et al.*, 2006). Desvios no valor de SASA para a cauda hidrofóbica podem sugerir mudanças no formato das micelas (KONIDALA *et al.*, 2006), enquanto que desvios dos valores de SASA dos grupos hidrofílicos podem ser atribuídos às interações intermoleculares entre as cabeças-polares. Em nossas simulações MD a contribuição de cada grupo para o valor total de SASA

permaneceu constante para C₁₂N-lactitol. Já para C₁₂N-lactosil foi observada diminuição gradual das contribuições provenientes dos grupos hidrofílicos galactosil e glucosil (Figura 5.13). Este decréscimo pode influenciar negativamente a hidratação da micela formada de C₁₂N-lactosil, uma vez que a grande quantidade de ligações de hidrogênio intermoleculares pode reduzir a ocorrência de interações monômero-solvente.

5.6.3 Interações inter-monômeros

A rede de ligações de hidrogênio desempenha um papel fundamental na estabilidade, conformação e solubilidade de compostos à base de açúcares, devido, principalmente, à presença de vários grupos hidroxila em sua estrutura. De maneira geral, a situação mais comum é cada grupo hidroxila estando associado com duas ligações de hidrogênio, uma como doador e outra como acceptor de ligação de hidrogênio. Adicionalmente, o grupo amino presente nas moléculas de C₁₂N-lactitol e C₁₂N-lactosil pode também atuar tanto como acceptor quanto doador de ligação de hidrogênio, apesar de que é esperado que uma pequena fração esteja na forma protonada em solução aquosa (DUPUY *et al.*, 1996). Interações intermoleculares, como as ligações de hidrogênio, afetam algumas propriedades físicas das moléculas e, neste caso específico, algumas propriedades estruturais dos agregados micelares (SVENSON, 2004). Assim, a grande quantidade de ligações de hidrogênio intermoleculares observada nas micelas formadas pelos tensoativos à base de açúcares pode influenciar alguns aspectos estruturais como tamanho, formato e estabilidade das micelas.

Neste trabalho, foi avaliado, em nível molecular, as interações inter-monômeros entre os grupos açúcar sobre os últimos 5 ns de simulação. O número total de ligações de hidrogênio intermoleculares por monômero encontrado para C₁₂N-lactitol foi 1,05 e para C₁₂N-lactosil 0,86 (Tabela 5.14). Considerando que a contribuição energética de cada ligação de hidrogênio é cerca de 5 kcal/mol, a diferença de 0,19 ligações de hidrogênio entre os dois sistemas micelares indicam que a formação de micelas contendo C₁₂N-lactitol é entalpicamente mais favorável que C₁₂N-lactosil por aproximadamente 0,95 kcal/mol de tensoativo (considerando apenas a componente de ligações de hidrogênio). PESTMAN *et al.* (1999) encontraram uma diferença entálpica similar para tensoativos com grupos amida, *N*-acetil-*N*-dodecil-lactosilamina e *N*-acetil-*N*-dodecil-1-deoxilactitol, no valor de 1,3 kcal/mol em favor do composto lactitol. Este resultado calorimétrico reflete as interações micela-micela,

monômero-micela e monômero-monômero, enquanto que a simulação MD apresentada neste trabalho avaliou somente a contribuição das interações monômero-monômero, oriundas das ligações de hidrogênio, para a entalpia de micelização.

Tabela 5.14 – Número médio de ligações de hidrogênio inter-monômero e monômero-solvente no decorrer dos últimos 5 ns de simulação MD

Átomo [†]	C ₁₂ N-lactitol				C ₁₂ N-lactosil			
	Inter-monômero		Monômero-solvente		Inter-monômero		Monômero-solvente	
	doador	aceptor	doador	aceptor	doador	aceptor	doador	aceptor
N	0.02	0.00	0.04	0.03	0.07	0.03	0.06	0.12
O2 (glc)	0.19	0.15	0.40	0.50	0.13	0.12	0.33	0.36
O3 (glc)	0.13	0.13	0.16	0.22	0.10	0.07	0.38	0.48
O4 (glc)		0.04		0.12		0.05		0.17
O5 (glc)	0.08	0.06	0.30	0.41		0.07		0.12
O6 (glc)	0.15	0.16	0.40	0.62	0.12	0.12	0.26	0.64
O2 (gal)	0.10	0.13	0.42	0.51	0.15	0.10	0.49	0.49
O3 (gal)	0.13	0.10	0.55	0.64	0.09	0.06	0.52	0.61
O4 (gal)	0.17	0.15	0.47	0.51	0.07	0.09	0.58	0.58
O5 (gal)		0.01		0.03		0.01		0.04
O6 (gal)	0.11	0.12	0.33	0.63	0.13	0.14	0.32	0.63
Total	1.07	1.05	3.07	4.22	0.86	0.86	2.93	4.23

[†]glc = grupo glucosil/glucitol; gal = grupo galactosil

A análise das contribuições individuais dos doadores e aceptores de ligações de hidrogênio inter-monômeros revelaram pequenas variações entre os dois sistemas. A maior diferença encontrada foi para o átomo O4–H do grupo galactosil, em que se observou a doação de 0,10 ligações de hidrogênio a mais no sistema contendo C₁₂N-lactitol, e para os átomos O3 do grupo glucosil/glucitol e O4 do grupo galactosil, que aceitam, cada um, 0,06 ligações de hidrogênio a mais também no sistema contendo C₁₂N-lactitol. Apesar do grupo

externo galactosil ser o mesmo em ambas as moléculas de tensoativo, a única hidroxila axial, presente no carbono C4, está mais exposta para a formação de interações inter- e intramoleculares. De fato, os átomos de oxigênio da cadeia flexível de glucitol, presente em C₁₂N-lactitol, são capazes de interagir mais facilmente e fortemente com a hidroxila axial (O4) do grupo galactosil.

5.6.4 Interações intra-monômeros

As micelas de C₁₂N-lactitol fazem um total de 1,37 ligações de hidrogênio intramolecular por monômero contra apenas 0,48 para o sistema contendo C₁₂N-lactosil (Tabela 5.15). Geralmente, ligações de hidrogênio intramoleculares são mais observadas em dissacarídeos cíclicos que em monossacarídeos, devido à possibilidade de interações entre os átomos de oxigênio proveniente dos dois grupos diferentes de açúcar presentes na mesma molécula. Neste caso, os ângulos torcionais ou diedros envolvendo a ligação glicosídica são de crucial importância para o estabelecimento de interações intra-moleculares de dissacarídeos. Dessa forma, as interações intra-monômeros mais frequentemente observadas envolveram átomos dos dois grupos açúcares, à exceção da interação O6–H...O4 que ocorre no grupo glucosil (glucitol) em ambos os sistemas micelares. No entanto, o fato de C₁₂N-lactitol possuir uma cadeia acíclica flexível lhe permitiu adotar conformações que facilitam a ocorrência de interações intramoleculares, e isto pode explicar a grande diferença encontrada entre estes dois sistemas micelares à base de açúcares. De fato, o sistema contendo C₁₂N-lactitol apresenta interações intra-monômeros mais frequentes entre os átomos de oxigênio pertencentes ao grupo glucitol, em especial os átomos O2, O4 e O5 (Tabela 5.15). Adicionalmente, na molécula de C₁₂N-lactitol, o átomo O5 pertence a um grupo hidroxila ao invés do grupo éter como em C₁₂N-lactosil, e dessa forma, pode tanto doar como aceitar ligações de hidrogênio.

Tabela 5.15 – Número médio de ligações de hidrogênio das principais interações intra-monômeros por moléculas no decorrer dos últimos 5 ns de simulação^a

Interação^b	C₁₂N-lactitol	C₁₂N-lactosil
N–H...O3	0.07	0.00
O2–H...O4	0.09	0.00
O2–H...O5	0.09	0.00
O3–H...O4	0.14	0.00
O3–H...O5(gal)	0.12	0.10
O5–H...O2	0.11	N.A.
O5–H...O2(gal)	0.20	N.A.
O6–H...O4	0.06	0.07
O6–H...O2(gal)	0.03	0.07
O2–H(gal)...O5	0.07	0.00
O2–H(gal)...O6	0.02	0.05
Total^c	1.37	0.48

^aSão mostradas apenas as interações com 0.05+ ligações de hidrogênio

^bÁtomos do grupo galactosil estão indicados por “gal”. Caso contrário, os átomos pertencem ao grupo glucosil/glucitol

^cConsiderando todas as ligações de hidrogênio intra-moleculares

5.6.5 Perfil de hidratação

Os sistemas micelares C₁₂N-lactitol e C₁₂N-lactosil mostraram capacidade de hidratação similar, com o primeiro sistema perfazendo uma média total de 3,07 e 4,22 ligações de hidrogênio como doador e acceptor, respectivamente, enquanto que o último faz 2,93 e 4,23 ligações de hidrogênio com a água por monômero (Tabela 5.14). As principais diferenças foram encontradas mais uma vez no grupo glucosil/glucitol. O grupo glucitol em C₁₂N-lactitol doa 0,29 ligações de hidrogênio a mais que o grupo glucosil em C₁₂N-lactosil, mas aceita 0,10 ligações a menos, devido à substituição do grupo éter por um grupo hidroxila em O5, que é capaz agora de doar ligações de hidrogênio para a água. O grupo amino também parece sofrer

influência da configuração do sacarídeo. A simulação MD mostrou que o grupo amino é capaz de fazer 0,11 ligações de hidrogênio a mais com a água na configuração cíclica, porém, é importante ter em mente que as cargas parciais atômicas para o nitrogênio foram diferentes para C₁₂N-lactitol (-0,39) e para C₁₂N-lactosil (-0,52) (Tabela 5.13, página 122). A capacidade de hidratação do grupo galactosil foi similar para ambos os sistemas micelares.

Apesar da semelhança da capacidade de hidratação, existiram diferenças particulares na contribuição atômica para as interações monômero-solvente. O átomo O3 do grupo glucosil faz 0,48 ligações de hidrogênio a mais com a água em C₁₂N-lactosil, enquanto que os átomos O2 e O5 do mesmo grupo fazem 0,21 e 0,59 ligações de hidrogênio a mais em C₁₂N-lactitol, respectivamente. Este surpreendente resultado para o átomo O3 pode ser explicado em termos da conformação preferencial adotada pelas moléculas de C₁₂N-lactitol no interior da micela. Foi observado que o átomo O3 do grupo glucitol em C₁₂N-lactitol interage bem com os átomos O4 e O5 dos grupos glucitol e galactosil, respectivamente (Tabela 5.15). Isto sugere uma conformação preferencial para esta molécula no interior da micela, em que o átomo O3 está localizado em uma região menos exposta ao solvente, como mostrado na Figura 5.14.

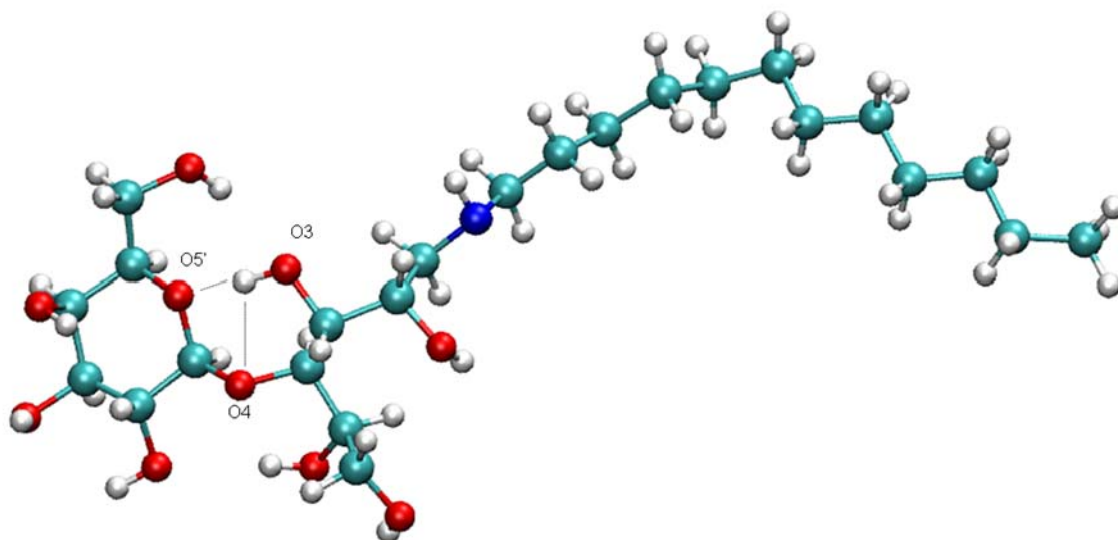


Figura 5.14 – Snapshot da simulação MD evidenciando uma das interações intra-moleculares mais frequentes observadas no sistema micelar C₁₂N-lactitol. O número médio das ligações de hidrogênio intra-molecular O3(glc)-H...O4(glc) and O3(glc)-H...O5(gal) é 0,14 e 0,12, respectivamente. Esta conformação adotada pelas moléculas de C₁₂N-lactitol previne o átomo O3(glc) do contato com a água.

5.6.6 Considerações gerais sobre as simulações MD

As simulações MD caracterizaram as propriedades estruturais e a rede de ligações de hidrogênio de sistemas micelares contendo 88 monômeros de C₁₂N-lactitol e C₁₂N-lactosil em solução aquosa. Ambos os sistemas exibiram tamanho e estabilidade similares, embora o sistema C₁₂N-lactitol tenha apresentado ao final da simulação fortes deformações ou protrusões que levaram a grandes diferenças com relação ao formato esférico inicial. A baixa contribuição das cadeias alquílicas de ambos os sistemas ao valor total de SASA indicaram uma alongação das micelas (KONIDALA *et al.*, 2006), enquanto que as diferentes contribuições ao SASA total proveniente dos dois grupos açúcar presentes na molécula de ambos os tensoativos indicaram um padrão diferente de ligações de hidrogênio.

O sistema micelar C₁₂N-lactitol faz mais ligações de hidrogênio intra- e intermolecular que o sistema C₁₂N-lactosil. O fato do oxigênio O5 do grupo glucitol em C₁₂N-lactitol pertencer ao grupo hidroxila, ao invés da função éter, contribuiu significativamente para esta diferença. Adicionalmente, a grande flexibilidade do grupo glucitol aumentou a ocorrência de ligações de hidrogênio intramoleculares no sistema micelar C₁₂N-lactitol. Apesar das diferenças estruturais entre ambos os tensoativos estudados, a capacidade de hidratação de suas micelas foi similar. A grande quantidade de ligações de hidrogênio observada no sistema micelar C₁₂N-lactitol sugere que seu processo de micelização é mais favorável que no sistema C₁₂N-lactosil, o que corrobora com estudos recentes que demonstram que um grupo alditol é mais favorável para a formação de micelas que um grupo aldose (PESTMAN *et al.*, 1999). Dessa forma, as simulações MD apontam para o uso de micelas de C₁₂N-lactitol, em detrimento de C₁₂N-lactosil, como veículos carreadores de fármacos.

O raio de giro, R_g , do sistema micelar C₁₂N-lactitol não permaneceu estável no decorrer dos 10 ns de simulação MD, o que pode ser indicativo de uma micela não-estável. Dessa forma, esse sistema foi submetido a mais 10 ns de simulação MD nas mesmas condições que a anterior, perfazendo um total de 20 ns, e verificou-se que o R_g para este sistema continuou a crescer levemente no decorrer da simulação. Este resultado pode ser devido à própria natureza das moléculas anfifílicas, em que sua parte hidrofóbica estará em contínuo movimento no interior da micela, e em especial, pelo grande número de conformações que podem ser adotadas pelas moléculas de C₁₂N-lactitol, que podem ocasionar contínuas diferenças estruturais no agregado, como observado na Figura 5.11a.

Conclusões Gerais

6 CONCLUSÕES GERAIS

Conseguiu-se obter sistemas microemulsionados utilizando compostos (tensoativo, cotensoativo e óleo) farmacologicamente aceitáveis, contribuindo assim para a sua aplicação em meio biológico. Obteve-se ainda um sistema microemulsionado isento de cotensoativo (sistema ME-D), que devido à ausência de etanol em sua composição, pode apresentar redução na toxicologia das microemulsões. Adicionalmente, sistemas auto-microemulsificantes, voltados para a administração oral de fármacos, foram obtidos, sendo um deles utilizando propilenoglicol ao invés de etanol como cotensoativo em sua composição (sistema ME-G), e outro utilizando sorbitol a fim de diminuir a quantidade de etanol utilizada (sistema ME-H).

Os sistemas microemulsionados obtidos foram capazes de solubilizar satisfatoriamente o diterpeno bioativo *trans*-desidrocrotonina (DCTN), parcialmente a *trans*-crotonina (CTN), e incapaz de solubilizar o triterpeno ácido acetilaleurítico (AAA), todos isolados das cascas do caule da espécie vegetal *Croton cajucara*. O sistema auto-microemulsificante ME-G, isento de etanol, também solubilizou satisfatoriamente a DCTN e não se observou precipitação significativa do produto natural com a diluição em água do sistema ME-G. Adicionalmente, os sistemas microemulsionados obtidos solubilizaram satisfatoriamente extratos e frações obtidos de três espécies vegetais: *Croton cajucara*, *Anacardium occidentale* e *Phyllanthus amarus*.

Os experimentos de caracterização físico-química permitiram confirmar a existência de microemulsões em cada sistema obtido, além de direcionar a aplicação de cada um desses sistemas quanto às vias de administração preferenciais. Nesse sentido, confirmou-se que o sistema ME-F não se tratava de uma microemulsão estável. Os estudos de reologia e de condutividade elétrica dos sistemas auto-microemulsificantes permitiram ainda prever as transições de microestruturas que ocorrem nesses sistemas com a diluição em água.

Os sistemas microemulsionados obtidos permitiram a realização de ensaios biológicos de extratos com baixa solubilidade nos excipientes comumente utilizados. Os ensaios antioxidantes evidenciaram ainda que a propriedade antioxidante dos extratos testados é diretamente proporcional à sua solubilidade nos sistemas microemulsionados testados. Adicionalmente, as microemulsões utilizadas não provocaram interferência significativa nos resultados antioxidativos obtidos, e apenas um efeito bactericida moderado frente às colônias de bactérias estudadas, o que pode ser considerado uma vantagem adicional desses sistemas.

Os estudos de simulação de Dinâmica Molecular (MD) permitiram caracterizar as propriedades estruturais de agregados micelares contendo moléculas de *N*-dodecilamino-1-deoxilactitol ($C_{12}N$ -lactitol) e *N*-dodecil-D-lactosilamina ($C_{12}N$ -lactosil). Os resultados computacionais obtidos corroboraram os dados experimentais de SANS e SAXS obtidos para o $C_{12}N$ -lactitol (DUPUY *et al.*, 1996; DUPUY *et al.*, 1998). Adicionalmente, as simulações MD apontaram para um processo de micelização mais favorável para sistemas alditóis, como o $C_{12}N$ -lactitol, e podem servir como parâmetro na obtenção de sistemas micelares de tensoativos à base de açúcares.

Os resultados obtidos neste trabalho permitiram avaliar que os sistemas microemulsionados obtidos, em especial os sistemas que não contêm etanol em sua composição, podem se constituir em alternativas viáveis para a veiculação de fármacos e extratos pouco solúveis nos excipientes comumente utilizados, com ganhos significativos na sua biodisponibilidade.

Referências Bibliográficas

REFERÊNCIAS

- ABOOFAZELI, R.; ZIA, H.; NEEDAHAM, T. E. Transdermal delivery of nicardipine: an approach to *in vitro* permeation enhancement. **Drug Delivery: journal of delivery and targeting of therapeutic agents**, v. 9, n. 4, p. 239-247, 2002.
- ACHARYA, A.; SANYAL, S. K.; MOULIK, S. P. Formation and characterization of a useful biological microemulsion system using mixed oil (ricebran and isopropyl myristate), polyoxyethylene(2)oleyl ether (Brij 92), isopropyl alcohol, and water. **Journal of Dispersion Science and Technology**, v. 22, n. 6, p. 551-561, 2001.
- AGATONOVIC-KUSTRIN, S.; GLASS, B. D.; WISCH, M. H.; ALANY, R. G. Prediction of a stable microemulsion formulation for the oral delivery of a combination of antitubercular drugs using ANN methodology. **Pharmaceutical Research**, v. 20, n. 11, p. 1760-1765, 2003.
- ALAMI, El-O.; HOLMBERG, K. Heterogemini surfactants, **Advances in Colloid and Interface Science**, v. 100-102, suplemento, p. 13-46, 2003.
- ALANY, R. G.; RADES, T.; NICOLL, J.; TUCKER, I. G.; DAVIES, N. M. W/O microemulsions for ocular delivery: evaluation of ocular irritation and precorneal retention. **Journal of Controlled Release**, v. 111, n. 1-2, p. 145-152, 2006.
- ALANY, R. G.; TUCKER, I. G.; DAVIES, N. M.; RADES, T. Characterizing colloidal structures of pseudoternary phase diagrams formed by oil/water/amphiphile systems. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, v. 27, n. 1, p. 31-38, 2001.
- ALVAREZ-FIGUEROA, M. J.; BLANCO-MÉNDEZ, J. Transdermal delivery of methotrexate: iontophoretic delivery from hydrogels and passive delivery from microemulsions. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 215, n. 1-2, p. 57-65, 2001.
- AOUDIA, M.; ZANA, R. Aggregation behavior of sugar surfactants in aqueous solutions: Effects of temperature and the addition of nonionic polymers. **Journal of Colloid and Interface Sciences**, v. 206, n. 1, p.158-167, 1998.
- ARAYA, H.; TOMITA, M.; HAYASHI, M. The novel formulation design of self-emulsifying drug delivery systems (SEEDS) type O/W microemulsion III: The permeation mechanism of a poorly water soluble drug entrapped O/W microemulsion in rat isolated intestinal membrane by the Ussing Chamber method. **Drug Metabolism and Pharmacokinetics**, v. 21, n. 1, p. 45-53, 2006.
- AREVALO, M. I.; ESCRIBANO, E.; CALPENA, A.; DOMÉNECH, J.; QUERALT, J. Rapid skin anesthesia using a new topical amethocaine formulation: a preclinical study. **Anesthesia and Analgesia**, v. 98, n. 5, p. 1407-1412, 2004.
- AUVRAY, X.; PETIPAS, C.; ANTHORE, R.; RICO-LATTES, I.; LATTES, A. X-ray diffraction study of the ordered lyotropic phases formed by sugar-based surfactants. **Langmuir**, v. 11, n. 2, p. 433-439, 1995.

AZEVEDO, C. H. M.; CARVALHO, J. P.; VALDUGA, C. J.; MARANHÃO, R. C. Plasma kinetics and uptake by tumor of a cholesterol-rich microemulsion (LDE) associated to etoposide oleate in patients with ovarian carcinoma. **Gynecologic Oncology**, v. 97, n. 1, p. 178-182, 2005.

BAROLI, B.; LÓPEZ-QUINTELA, M. A.; DELGADO-CHARRO, M. B.; FADDA, A. M.; BLANCO-MÉNDEZ, J. Microemulsions for topical delivery of 8-methoxsalen. **Journal of Controlled Release**, v. 69, n. 1, p. 209-218, 2000.

BHATTACHARYA, S.; ACHARYA, S. N. G. Vesicle and tubular microstructure formation from synthetic sugar-linked amphiphiles. Evidence of vesicle formation from single-chain amphiphiles bearing a disaccharide headgroup. **Langmuir**, v. 16, n. 1, p. 87-97, 2000.

BHATTACHARYA, S.; HALDAR, J. Molecular design of surfactants to tailor its aggregation properties. **Colloids Surfaces A: physicochemical and engineering aspects**, v. 205, n. 1-2, p. 119-126, 2002.

BIGHETTI, E. J.; HIRUMA-LIMA, C. A.; GRACIOSO, J. S.; SOUZA BRITO, A. R. M. Antiinflammatory and antinociceptive effects in rodents of the essential oil of *Croton cajucara* Benth. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 51, n. 12, p. 1447-1453, 1999.

BIRUSS, B.; KÄHLIG, H.; VALENTA, C. Evaluation of an eucalyptus oil containing topical drug delivery system for selected steroid hormones. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 328, n. 2, p. 142-151, 2007.

BLANZAT, M. **Premiers Analogues Catanioniques du Galactosylcéramide. Synthèse Ciblée et Évaluation de leurs Propriétés Anti-VIH**. 2000. 178f. Thèse (Doutorado em Engenharia Química), Université Paul Sabatier, Toulouse, França, 2000.

BOGUSZ, S.; VENABLE, R. M.; PASTOR, R. W. Molecular dynamics simulation of octyl glucoside micelles: Dynamic properties. **The Journal of Physical Chemistry B**, v. 105, n. 35, p. 8312-8321, 2001.

BOGUSZ, S.; VENABLE, R.M.; PASTOR, R. W. Molecular dynamics simulations of octyl glucoside micelles: Structural properties. **The Journal of Physical Chemistry B**, v. 104, n. 23, p. 5462-5470, 2000.

BOLTRI, L.; MOREL, S.; TROTTA, M.; GASCO, M. R. *In vitro* transdermal permeation of nifedipine from thickened microemulsions. **Journal of Pharmacie de Belgique**, v. 49, n. 4, p. 315-320, 1994.

BOLZINGER, M. A.; CARDUNER, T. C.; POELMAN, M. C. Bicontinuous sucrose ester microemulsion: a new vehicle for topical delivery of niflumic acid. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 176, n. 1, p. 39-45, 1998.

BOLZINGER-THEVENIN, M. A.; GROSSIORD, J. L.; POELMAN, M. C. Characterization of a Sucrose Ester Microemulsion by Freeze Fracture Electron Micrograph and Small Angle Neutron Scattering Experiments. **Langmuir**, v. 15, n.7, p. 2307-2315, 1999.

BONACUCINA, G.; CESPI, M.; MISICI-FALZI, M.; PALMIERI, G. F. Colloidal Soft Matter as Drug Delivery System. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 98, n. 1, p. 1-42, 2009.

BOON, J. P.; YIP, S. Correlated dynamics and light scattering in microemulsions. **Optica Acta**, v. 29, n. 9, p. 1167-1169, 1982.

BORHADE, V.; NAIR, H.; HEGDE, D. Design and Evaluation of Self-Microemulsifying Drug Delivery System (SMEDDS) of Tacrolimus. **AAPS PharmSciTech**, v. 9, n. 1, p. 13-21, 2008.

BRASHER, L. L.; HERRINGTON, K. L.; KALER, E. W. Electrostatic effect on the phase behavior of aqueous cetyltrimethylammonium bromide and sodium octyl sulfate mixtures of added sodium bromide. **Langmuir**, v. 11, n. 11, p. 4267-4277, 1995.

BRIME, B.; FRUTOS, P.; BRINGAS, P.; NIETO, A.; BALLESTEROS, M. P.; FRUTOS, G. Comparative pharmacokinetics and safety of a novel lyophilized amphotericin B lecithin-based oil-water microemulsion and amphotericin B deoxycholate in animal models. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 52, n. 1, p. 103-109, 2003.

BRIME, B.; MOLERO, G.; FRUTOS, P.; FRUTOS, G. Comparative therapeutic efficacy of a novel lyophilized amphotericin B lecithin-based oil-water microemulsion and deoxycholate-amphotericin B in immunocompetent and neutropenic mice infected with *Candida albicans*. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 22, n. 5, p. 451-458, 2004.

BRIME, B.; MORENO, M. A.; FRUTOS, G.; BALLESTEROS, M. P.; FRUTOS, P. Amphotericin B in oil-water lecithin-based microemulsions: formulation and toxicity evaluation. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 91, n. 4, p. 1178-1185, 2002.

BRODY, O. V.; FUOSS, R. M. Bolaform electrolytes. V. Conductance of some bisquaternary salts in methanol and in ethanol. **The Journal of Physical Chemistry**, v. 60, n. 2, p. 156-160, 1956.

BRUCE, C. D.; BERKOWITZ, M. L.; PERERA, L.; FORBES, M. D. E. Molecular dynamics simulations of sodium dodecyl sulfate micelle in water: Micellar structural characteristics and counterion distribution. **The Journal of Physical Chemistry B**, v. 106, n. 42, p. 3788-3793, 2002.

BRUCE, C. D.; SENEPATI, S.; BERKOWITZ, M. L.; PERERA, L.; FORBES, M. D. E. Molecular dynamics simulations of sodium dodecyl sulfate micelle in water: The behavior of water. **The Journal of Physical Chemistry B**, v. 106, n. 42, p. 10902-10907, 2002.

CALIXTO, J. B. Biodiversidade como fonte de medicamentos. **Ciência e Cultura**, v. 55, n. 3, p. 37-39, 2003.

CALIXTO, J. B.; SANTOS, A. R.; FILHO, V. C.; YUNES, R. A. A review of the plants of the genus *Phyllanthus*: Their chemistry, pharmacology and therapeutic potential. **Medicinal Research Review**, v. 18, n. 4, p. 225-258, 1998.

CAMPOS, A. R.; ALBUQUERQUE, F. A. A.; RAO, V. S. N.; MACIEL, M. A. M.; PINTO, A. C. Investigations on the antinociceptive activity of crude extracts from *Croton cajucara* leaves in mice. **Fitoterapia**, v. 73, n.2, p. 116-120, 2002.

CASE, D. A.; DARDEN, T. A.; CHEATHAM III, T. E.; SIMMERLING, C. L.; WANG, J.; DUKE, R. E.; LUO, R.; MERZ, K. M.; PEARLMAN, D. A.; CROWLEY, M.; WALKER, R. C.; ZHANG, W.; WANG, B.; HAYIK, S.; ROITBERG, A.; SEABRA, G.; WONG, K. F.; PAESANI, F.; WU, X.; BROZELL, S.; TSUI, V.; GOHLKE, H.; YANG, L.; TAN, C.; MONGAN, J.; HORNAK, V.; CUI, G.; BEROZA, P.; MATHEWS, D. H.; SCHAFMEISTER, C.; ROSS, W. S.; KOLLMAN, P. A. **AMBER 9**, University of California, San Francisco, 2006.

CHAN, J.; EL MAGHRABY, G. M. M.; CRAIG, J. P.; ALANY, R. G. Phase transition water-in-oil microemulsions as ocular drug delivery systems: *In vitro* and *in vivo* evaluation. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 328, n. especial, p. 65-71, 2007.

CHANDLER, D. Interfaces and the driving force of hydrophobic assembly. **Nature**, v. 437, n. 7059, p. 640-647, 2005.

CHANGEZ, M.; CHANDER, J.; DINDA, A. K. Transdermal permeation of tetracaine hydrochloride by lecithin microemulsion: *in vivo*. **Colloids and Surface B: biointerfaces**, v. 48, n. 1, p. 58-66, 2006.

CHANGEZ, M.; VARSHNEY, M.; CHANDER, J.; DINDA, A. K. Effect of the composition of lecithin/*n*-propanol/isopropyl myristate/water microemulsions on barrier properties of mice skin for transdermal permeation of tetracaine hydrochloride: *in vitro*. **Colloids and Surfaces B: biointerfaces**, v. 50, n. 1, p. 18-25, 2006.

CHANWITHEESUK, A.; TEERAWUTGULRAG, A.; RAKARIYATHAM, N. Screening of antioxidant activity and antioxidant compounds of some edible plants of Thailand. **Food Chemistry**, v. 92, n. 3, p. 491-497, 2005

CHEN, H.; CHANG, X.; DU, D.; LI, J.; XU, H.; YANG, X. Microemulsion-based hydrogel formulation of ibuprofen for topical delivery. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 315, n. 1-2, p. 52-58, 2006.

CHEN, H.; CHANG, X.; WENG, T.; ZHAO, X.; GAO, Z.; YANG, Y.; XU, H.; YANG, X. A study of microemulsion systems for transdermal delivery of triptolide. **Journal of Controlled Release**, v. 98, n. 3, p. 427-436, 2004.

CHEN, Y.; LI, G.; WU, X.; CHEN, Z.; HANG, J.; QIN, B.; CHEN, S.; WANG, R. Self-Microemulsifying Drug Delivery System (SMEDDS) of Vinpocetine: Formulation Development and *In Vivo* Assessment. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, v. 31, n. 1, p. 118-125, 2008.

CHONG, T. T.; HASHIM, R.; BRYCE, R. A. Molecular dynamics simulation of monoalkyl glycoside micelles in aqueous solution: influence of carbohydrate headgroup stereochemistry. **The Journal of Physical Chemistry B**, v. 110, n. 10, p. 4978-4984, 2006.

CIRRI, M.; MURA, P.; MORA, P. C. Liquid spray formulations of xibornol by using self-microemulsifying drug delivery systems. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 340, n. 1-2, p. 84-91, 2007.

CONSTANTINIDIS, P. P.; SCALART, J.-P. Formulation and physical characterization of water-in-oil microemulsions containing long- versus medium-chain glycerides. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 158, n. 1, p. 57-68, 1997.

COPPOLA, L.; GORDANO, A.; PROCOPIO, A.; SINDONA, G. Phase equilibria and physical-chemical properties of sugar-based surfactants in aqueous solutions. **Colloids and Surfaces A: physicochemical and engineering aspects**, v. 196, n. 2-3, p. 175-187, 2002.

CORREA, M. A.; SCARPA, M. V.; FRANZINI, M. C.; OLIVEIRA, A. G. On the incorporation of the non-steroidal anti-inflammatory naproxen into cationic O/W microemulsions. **Colloids and Surfaces B: biointerfaces**, v. 43, n. 2, p. 108-114, 2005.

CORTESI, R.; ESPOSITO, E.; MAIETTI, A.; MENEGATTI, E.; NASTRUZZI, C. Formulation study for the antitumor drug camptothecin: liposomes, micellar solutions and a microemulsion. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 159, n. 1, p. 95-103, 1997.

CORTESI, R.; NASTRUZZI, C. Liposomes, micelles and microemulsions as new delivery systems for cytotoxic alkaloids. **Pharmaceutical Sciences and Technology Today**, v. 2, n. 7, p. 288-298, 1999.

COSTA, M. P.; MAGALHÃES, N. S. S.; GOMES, F. E. S.; MACIEL, M. A. M. Uma revisão das atividades biológicas da *trans*-desidrocrotolina, um produto natural obtido de *Croton cajucara*. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 17, n. 2, p. 275-286, 2007.

CRAGG, G. M.; NEWMAN, D. J.; SNADER, K. M. Natural Products in drug discovery and development. **Journal of Natural Products**, v. 60, n. 1, p. 52-60, 1997.

CUI, J.; YU, B.; ZHAO, Y.; ZHU, W.; LI, H.; LOU, H.; ZHAI, G. Enhancement of oral absorption of curcumin by self-microemulsifying drug delivery systems. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 371, n. 1-2, p. 148-155, 2009.

D'ANTONA, P.; PARKER JR., W. O.; ZANIRATO, M. C.; ESPOSITO, E.; NASTRUZZI, C. Rheologic and NMR characterization of monoglyceride-based formulations. **Journal of Biomedical Materials Research**, v. 52, n. 1, p. 40-52, 2000.

D'CRUZ, O. J.; UCKUN, F. M. Intravaginal toxicity studies of a gel-microemulsion formulation of spermicidal vanadocenes in rabbits. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 170, n. 2, p. 104-112, 2001.

D'CRUZ, O. J.; YIV, S. H.; WAURZYNIAK, B.; UCKUN, F. M. Contraceptive efficacy and safety studies of a novel microemulsion-based lipophilic vaginal spermicide. **Fertility and Sterility**, v. 75, n. 1, p. 115-124, 2001.

DALMORA, M. E.; 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. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 222, n. 1, p. 45-55, 2001.

DANTAS, T. N. C.; BELTRAME, L. T. C.; DANTAS NETO, A. A.; MOURA, M. C. P. A. Use of microemulsions for removal of color and dyes from textile wastewater. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v. 79, n. 6, p. 645-650, 2004.

DANTAS, T. N. C.; DANTAS NETO, A. A.; MOURA, E. F. Microemulsion systems applied to breakdown petroleum emulsions. **Journal of Petroleum Science and Engineering**, v. 32, n. 2-4, p. 145-149, 2001.

DANTAS, T. N. C.; HENRIQUE NETO, M.; DANTAS NETO, A. A.; MOURA, M. C. P. A.; BARROS NETO, E. L. New surfactant for gallium and aluminum extraction by microemulsion. **Industrial and Engineering Chemistry Research**, v. 44, n. 17, p. 6784-6788, 2005.

DESAI, K. G. H. Enhanced skin permeation of rofecoxib using topical microemulsion gel, **Drug Development Research**, v. 63, n. 1, p. 33-40, 2004.

DJORDJEVIC, L.; PRIMORAC, M.; STUPAR, M. *In vitro* release of diclofenac diethylamine from caprylocaproyl macrogolglycerides based microemulsions. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 296, n. 1-2, p. 73-79, 2005.

DJORDJEVIC, L.; PRIMORAC, M.; STUPAR, M.; KRAJISNIK, D. Characterization of caprylocaproyl macrogolglycerides based microemulsion drug delivery vehicles for an amphiphilic drug. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 271, n. 1-2, p. 11-19, 2004.

DREHER, F.; WALDE, P.; WALTHER, P.; WEHRLI, E. Interaction of a lecithin microemulsion gel with human stratum corneum and its effect on transdermal transport. **Journal of Controlled Release**, v. 45, n. 2, p. 131-140, 1997.

DRUMMOND, C. J.; WELLS, D. Nonionic lactose and lactitol based surfactants: Comparison of some physico-chemical properties. **Colloids and Surfaces A: physicochemical and engineering aspects**, v. 141, n. 1, p. 131-142, 1998.

DUPUY, C.; AUVRAY, X.; PETIPAS, C.; ANTHORE, R.; COSTES, F.; RICO-LATTES, I.; LATTES, A. Small angle X-ray and neutron scattering study of the micellization of (*N*-alkylamino)-1-deoxylactitols in water. **Langmuir**, v. 12, n. 13, p. 3162-3172, 1996.

DUPUY, C.; AUVRAY, X.; PETIPAS, C.; ANTHORE, R.; RICO-LATTES, I.; LATTES, A. Influence of structure of polar head on the micellization of lactose-based surfactants. Small angle X-ray and neutron scattering study. **Langmuir**, v. 14, n. 1, p. 91-98, 1998.

EL MAGHRABY, G. M. Self-microemulsifying and microemulsion systems for transdermal delivery of indomethacin: Effect of phase transition. **Colloids and Surfaces B: biointerfaces**, v. 75, n. 2, p. 595-600, 2010.

ENGBERTS, J. B. F. N.; FERNANDEZ, E.; GARCIA-RIO, L.; LEIS, J. R. Water-in-oil microemulsions as reaction media for a Diels-Alder reaction between *N*-ethylmaleimide and cyclopentadiene. **Journal of Organic Chemistry**, v. 71, n. 11, p. 4111-4117, 2006.

- ESCRIBANO, E.; CALPENA, A. C.; QUERALT, J.; OBACH, R.; DOMÉNECH, J. Assessment of diclofenac permeation with different formulations: anti-inflammatory study of a selected formula. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 19, n. 4, p. 203-210, 2003.
- ESCRIBANO, E.; OBACH, M.; ARÉVALO, M. I.; CALPENA, A. C.; DOMENECH, J.; QUERALT, J. Rapid human skin permeation and topical anaesthetic activity of a new amethocaine microemulsion. **Skin Pharmacology and Physiology**, v. 18, n. 6, p. 294-300, 2005.
- ESPOSITO, E.; BORTOLOTTI, F.; MENEGATTI, E.; CORTESI, R. Amphiphilic association systems for Amphotericin B delivery. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 260, n. 2, p. 249-260, 2003.
- FAEDER, J.; ALBERT, M. V.; LADANYI, B. M. Molecular dynamics simulations of the interior of aqueous reverse micelles: A comparison between sodium and potassium counterions. **Langmuir**, v. 19, n. 6, p. 2514-2520, 2003.
- FAEDER, J.; LADANYI, B. M. Solvation dynamics in aqueous reverse micelles: A computer simulation study. **The Journal of Physical Chemistry B**, v. 105, n. 45, p. 11148-11158, 2001.
- FAEDER, J.; LADANYI, B. M. Solvation dynamics in reverse micelles: The role of headgroup-solute interactions. **The Journal of Physical Chemistry B**, v. 109, n. 14, p. 6732-6740, 2005.
- FANG, S.-H.; RAO, Y. K.; TZENG, Y.-M. Anti-oxidant and inflammatory mediator's growth inhibitory effects of compounds isolated from *Phyllanthus urinaria*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 116, n. 2, p. 333-340, 2008.
- FANUN, M.; WACHTEL, E.; ANTALEK, B.; ASERIN, A.; GARTI, N. A study of the microstructure of four-component sucrose ester microemulsions by SAXS and NMR. **Colloids and Surfaces A: physicochemical and engineering aspects**, v. 180, n. 1-2, p. 173-186, 2001.
- FARIAS, R. A. F.; NETO, M. F. O.; VIANA, G. S. B.; RAO, V. S. N. Effects of *Croton cajucara* extract on serum lipids of rats fed a high fat diet. **Phytotherapy Research**, v. 10, n. 8, p. 697-699, 1996.
- FARNSWORTH, N. R.; SOEJARTO, D. D. Potential consequence of plant extinction in the United States on the current and future availability of prescription drugs. **Economic Botany**, v. 39, n. 2, p. 231-240, 1985.
- FATOUROS, D. G.; NIELSEN, F. S.; DOUROUMIS, D.; HADJILEONTIADIS, L. J.; MULLERTZ, A. *In vitro-in vivo* correlations of self-emulsifying drug delivery systems combining the dynamic lipolysis model and neuro-fuzzy networks. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 69, n. 3, p. 887-898, 2008.
- FENDLER, J. H.; FENDLER, E. J. **Catalysis in micellar and macromolecular systems**. New York: Academic Press, 1975.

FIUME, Z. Final report on the safety assessment of lecithin and hydrogenated lecithin. **International Journal of Toxicology**, v. 20, suplemento 1, p. 21-45, 2001.

FLANAGAN, J.; SINGH, H. Microemulsions: a potential delivery systems for bioactives in food. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 46, n. 3, p. 221-237, 2006.

FORMARIZ, T. P.; URBAN, M. C. C.; SILVA JÚNIOR, A. A.; GREMIÃO, M. P. D.; OLIVEIRA, A. G. Microemulsões e fases líquidas cristalinas como sistemas de liberação de fármacos. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 41, n. 3, p. 301-313, 2005.

GAO, P.; RUSH, B. D.; PFUND, W. P.; HUANG, T.; BAUER, J. M.; MOROZOWICH, W.; KUO, M.-S.; HAGEMAN, M. J. Development of a supersaturable SEDDS (S-SEDDS) formulation of paclitaxel with improved oral bioavailability. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 92, n. 12, p. 2386-2398, 2003.

GARELLI-CALVET, R.; LATGE, P.; RICO, I.; LATTES, A.; PUGET, A. A new surfactant series, the *N*-alkylamino-1-deoxylactitols: Applications for extraction of 'op' opiate receptors from frog brain. **Biochimica et Biophysica Acta: biomembranes**, v. 1109, n. 1, p. 55-58, 1992.

GARTI, N.; AVRAHAMI, M.; ASERIN, A. Improved solubilization of celecoxib in U-type nonionic microemulsions and their structural transitions with progressive aqueous dilution. **Journal of Colloid and Interface Sciences**, v. 299, n. 1, p. 352-365, 2006.

GARTI, N.; CLEMENT, V.; LESER, M.; ASERIN, A.; FANUM, M. Sucrose ester microemulsions. **Journal of Molecular Liquids**, v. 80, n. 2-3, p. 253-296, 1999.

GARTI, N.; YAGHMUR, A.; ASERIN, A.; SPERNATH, A.; ELFAKES, R.; EZRAHI, S. Solubilization of active molecules in microemulsions for improved environmental protection. **Colloids and Surfaces A: physicochemical and engineering aspects**, v. 230, n. 1-3, p. 183-190, 2004.

GERSHANIK, T.; BENITA, S. Self-dispersing lipid formulations for improving oral absorption of lipophilic drugs. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 50, n. 1, p. 179-188, 2000.

GODDEERIS, C.; COACCI, J.; VAN DEN MOOTER, G. Correlation between digestion of the lipid phase of SMEDDS and release of the anti-HIV drug UC 781 and the anti-mycotic drug enilconazole from SMEDDS. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 66, n. 2, p. 173-181, 2007.

GODDEERIS, C.; CUPPO, F.; REYNAERS, H.; BOUWMAN, W. G.; VAN DEN MOOTER, G. Light scattering measurements on microemulsions: Estimation of droplet sizes. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 312, n. 1-2, p. 187-195, 2006.

GOMES, F. E. S. **Obtenção de novos tensoativos cataniônicos hidrossolúveis**. 2004. __ f. Dissertação (Mestrado em Química) – Programa de Pós-Graduação em Química, Centro de Ciências Exatas e da Terra, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, 2004.

GOMES, F. E. S.; ANJOS, G. C.; DANTAS, T. N. C.; MACIEL, M. A. M.; ESTEVES, A.; ECHEVARRIA, A. Obtenção de nanoformulações do tipo mmicromeulsão objetivando a biodisponibilização de *Anacardium occidentale* e sua eficiência como agente antioxidante. **Revista Fitos**, v. 2, n. 3, p. 82-88, 2006.

GOMES, F. E. S.; MORAES, E. K. L.; MACIEL, M. A. M.; MIRANDA, A. F.; ECHEVARRIA, A. Solubilização de extratos de *Croton cajucara* Benth. em sistemas microemulsionados e avaliação de sua atividade antioxidante. REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE QUÍMICA, 30ª, 2007, Aguas de Lindóia, (SP). Anais... Aguas de Lindóia: SBQ, 2007.

GONÇALVES, J. L. S.; LOPES, R. C.; OLIVEIRA, D. B.; COSTA, S. S.; MIRANDA, M. M. F. S.; ROMANOS, M. T. V.; SANTOS, N. S. O.; WIGG, M. D. *In vitro* anti-rotavirus activity of some medicinal plants used in Brazil against diarrhea. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 99, n. 3, p. 403-407, 2005.

GROVE, M.; MÜLLERTZ, A.; NIELSEN, J. L.; PEDERSEN, G. P. Bioavailability of seocalcitol II: Development and characterization of self-microemulsifying drug delivery systems (SMEDDS) for oral administration containing medium and long chain triglycerides. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 28, n. 3, p. 233-242, 2006.

GROVE, M.; MÜLLERTZ, A.; NIELSEN, J. L.; PEDERSEN, G. P. Bioavailability of seocalcitol III: Administration of lipid-based formulations to minipigs in the fasted and fed state. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 31, n. 1, p. 8-15, 2007.

GUPTA, R. R.; JAIN, S. K.; VARSHNEY, M. AOT water-in-oil microemulsions as a penetration enhancer in transdermal drug delivery of 5-fluorouracil. **Colloids and Surfaces B: biointerfaces**, v. 41, n. 1, p. 25-32, 2005.

GUPTA, S.; MOULIK, S. P.; LALA, S.; BASU, M. K.; SANYAL, S. K.; DATTA, S. Designing and testing of an effective oil-in-water microemulsion drug delivery system for *in vivo* application. **Drug Delivery: journal of delivery and targeting of therapeutic agents**, v. 12, n. 5, p. 267-273, 2005.

GURSOY, N.; GARRIGUE, J.-S.; RAZAFINDRATSITA, A.; LAMBERT, G.; BENITA, S. Excipients effects on *in vitro* cytotoxicity of a novel paclitaxel self-emulsifying drug delivery system. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 92, n. 12, p. 2411-2418, 2003.

HARISH, R.; SHIVANANDAPPA, T. Antioxidant activity and hepatoprotective potential of *Phyllanthus niruri*. **Food Chemistry**, v. 95, n. 2, p. 180-185, 2006.

HASSE, A.; KEIPERT, S. Development and characterization of microemulsions for ocular application. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 43, n. 2, p. 179-183, 1997.

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

HEUSCHKEL, S.; GOEBEL, A.; NEUBERT, R. H. H. Microemulsions – Modern Colloidal Carrier for Dermal and Transdermal Drug Delivery. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 97, n. 2, p. 603-631, 2008.

HOAR, T. P.; SCHULMAN, J. H. Transparent water-in-oil dispersions: the oleopathic hydro-micelle. **Nature**, v. 152, n. 3847, p. 102-103, 1943.

HOLM, R.; PORTER, C. J. H.; EDWARDS, G. A.; MÜLLERTZ, A.; KRISTENSEN, H. G.; CHARMAN, W. N. Examination of oral absorption and lymphatic transport of halofantrine in a triple-cannulated canine model after administration in self-microemulsifying drug delivery system (SMEDDS) containing structured triglycerides. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 20, n. 1, p. 91-97, 2003.

HOLMBERG, K. Natural surfactants. **Current Opinion in Colloid and Interface Sciences**, v. 6, n. 2, p. 148-159, 2001.

HOLMBERG, K.; JÖNSSON, B.; KRONBERG, B.; LINDMAN, B. **Surfactants and Polymers in Aqueous Solution**. 2. ed. West Sussex, Inglaterra: Wiley, 2003. 545 p.

HU, Z.; TAWA, R.; KONISHI, T.; SHIBATA, N.; TAKADA, K. A novel emulsifier, Labrasol, enhances gastrointestinal absorption of gentamicin. **Life Sciences**, v. 69, n. 24, p. 2899-2910, 2001.

HUA, L.; WEISAN, P.; JIAYU, L.; YING, Z. Preparation, evaluation, and NMR characterization of vinpocetine microemulsion for transdermal delivery. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, v. 30, n. 6, p. 657-666, 2004.

HUBBARD, S. J.; THORNTON, J. M. **NACCESS**. Department of Biochemistry and Molecular Biology, University College London, 1993.

HWANG, S. R.; LIM, S.-J.; PARK, J.-S.; KIM, C.-K. Phospholipid-based microemulsion formulation of all-*trans*-retinoic acid for parenteral administration. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 276, n. 1-2, p. 175-183, 2004.

IUPAC. **Compendium of Chemical Terminology: the Gold Book**. 2. ed. Oxford: Blackwell Scientific Publications, 1997. ISBN 0-9678550-9-8. Disponível em: <<http://goldbook.iupac.org/H02907.html>>. Acesso em: 16 mar. 2010.

ISRAELACHVILI, J. N.; MITCHELL, D. J.; NINHAM, B. W. Theory of self-assembly of hydrocarbon amphiphiles into micelles and bilayers. **Journal of the Chemical Society, Faraday Transactions 2: molecular and chemical physics**, v. 72, p. 1525-1568, 1976.

JOHNSON JR., C. S. Diffusion ordered nuclear magnetic resonance spectroscopy: principles and applications. **Progress in Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy**, v. 34, n. 3-4, p. 203-256, 1999.

JORGENSEN, W. L.; MAXWELL, D. S.; TIRADO-RIVES, J. Development and testing of the OPLS all-atom force field on conformation energetics and properties of organic liquids. **Journal of the American Chemical Society**, v. 118, n. 45, p. 11225-11236, 1996.

JUNPING, W.; TAKAYAMA, K.; NAGAI, T.; MAITANI, Y. Pharmacokinetics and antitumor effects of vincristine carried by microemulsions composed of PEG-lipid, oleic acid, vitamin E and cholesterol. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 251, n. 1-2, p. 13-21, 2003.

JURKOVIC, P.; SENTJURC, M.; GASPERLIN, M.; KRISTL, J.; PECAR, S. Skin protection against ultraviolet induced free radicals with ascorbyl palmitate in microemulsions. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 56, n. 1, p.59-66, 2003.

JURKOVIC, P.; SENTJURC, M.; KRISTL, J.; PECAR, S.; GASPERLIN, M. Comparison of two ascorbic acid derivatives effectiveness for scavenging ultraviolet-induced free radicals in the skin. **Drug Delivery Science and Technology**, v. 14, n. 3, p. 229-233, 2004.

KAHLWEIT, M.; STREY, R.; BUSSE, G. Microemulsions: A Qualitative Thermodynamic Approach. **The Journal of Physical Chemistry**, v. 94, n. 10, p. 3881-3894, 1990.

KALER, E. W.; HERRINGTON, K. L.; MURTHY, A. K.; ZASADZINSKI, J. A. N. Phase behavior and structures of mixtures of anionic and cationic surfactants. **The Journal of Physical Chemistry**, v. 96, n. 16, p. 6698-6707, 1992.

KANG, B. K.; CHON, S. K.; KIM, S. H.; JEONG, S. Y.; KIM, M. S.; CHO, S. H.; LEE, H. B.; KHANG, G. Controlled release of paclitaxel from microemulsion containing PLGA and evaluation of anti-tumor activity *in vitro* and *in vivo*. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 286, n. 1-2, p. 147-156, 2004.

KANG, B. K.; LEE, J. S.; CHON, S. K.; JEONG, S. Y.; YUK, S. H.; KHANG, G.; LEE, H. B.; CHO, S. H. Development of self-microemulsifying drug delivery systems (SMEDDS) for oral bioavailability enhancement of simvastatin in beagle dogs. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 274, n. 1-2, p. 65-73, 2004.

KANTARCI, G.; ÖZGÜNEY, I.; KARASULU, H. Y.; GÜNERI, T.; BASDEMIR, G. *In vitro* permeation of diclofenac sodium from novel microemulsion formulations through rabbit skin. **Drug Development Research**, v. 65, n. 1, p. 17-25, 2005.

KASSUYA, C. A. L.; SILVESTRE, A.; LIMA JR., O. M.; MAROTTA, D. M.; REHDER, V. L. G.; CALIXTO, J. B. Antiinflammatory and antiallodynic actions of the lignan niranthin isolated from *Phyllanthus amarus*: Evidence for interaction with platelet activating factor receptor. **European Journal of Pharmacology**, v. 546, n. 1-3, p. 182-188, 2006.

KASSUYA, C. A. L.; SILVESTRE, A.; REHDER, V. L. G.; CALIXTO, J. B. Anti-allodynic and anti-oedematogenic properties of the extract and lignans from *Phyllanthus amarus* in models of persistent inflammatory and neuropathic pain. **European Journal of Pharmacology**, v. 478, n. 2-3, p. 145-153, 2003.

KAWAKAMI, K.; YOSHIKAWA, T.; HAYASHI, T.; NISHIHARA, Y.; MASUDA, K. Microemulsion formulation for enhanced absorption of poorly soluble drugs. II. *In vivo* study. **Journal of Controlled Release**, v. 81, n. 1-2, p. 75-82, 2002.

KAWAKAMI, K.; YOSHIKAWA, T.; MOROTO, Y.; KANAOKA, E.; TAKAHASHI, K.; NISHIHARA, Y.; MASUDA, K. Microemulsion formulation for enhanced absorption of

poorly soluble drugs. I. Prescription design. **Journal of Controlled Release**, v. 81, n. 1-2, p. 65-74, 2002.

KHOO, S. M.; HUMABERSTONE, A. J.; PORTER, C. J. H.; EDWARDS, G. A.; CHARMAN, W. N. Formulation design and bioavailability assessment of lipidic self-emulsifying formulations of halofantrine. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 167, n. 1-2, p. 155-164, 1998.

KIM, C.-K.; CHO, Y.-J.; GAO, Z.-G. Preparation and evaluation of biphenyl dimethyl dicarboxylate microemulsions for oral delivery. **Journal of Controlled Release**, v. 70, n. 1-2, p. 149-155, 2001.

KIM, H.-J.; YOON, K. A.; HAHN, M.; PARK, E.-S.; CHI, S.-C. Preparation and *in vitro* evaluation of self-microemulsifying drug delivery systems containing idebenone. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, v. 26, n. 5, p. 523-529, 2000.

KIM, S. K.; LEE, E. H.; VAISHALI, B.; LEE, S.; LEE, Y.-K.; KIM, C.-Y.; MOON, H. T.; BYUN, Y. Tricaprylin microemulsion for oral delivery of low molecular weight heparin conjugates. **Journal of Controlled Release**, v. 105, n. 1-2, p. 32-42, 2005.

KIRSCHNER, K. N.; WOODS, R. J. Solvent interactions determine carbohydrate conformation. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 98, n. 19, p. 10541-10545, 2001.

KLIER, J.; TUCKER, C. J.; KALANTAR, T. H.; GREEN, D. P. Properties and applications of microemulsions. **Advanced Materials**, v. 12, n. 23, p. 1751-1757, 2000.

KOEHN, F. E.; CARTER, G. T. The evolving role of natural products in drug discovery. **Nature Reviews in Drug Discovery**, v. 4, n. 3, p. 206-220, 2005.

KOGAN, A.; GARTI, N. Microemulsions as transdermal drug delivery vehicles. **Advances in Colloid and Interface Science**, v. 123-126, número especial, p. 369-385, 2006.

KONIDALA, P.; HE, L.; NIEMEYER, B. Molecular dynamics characterization of *n*-octyl- β -D-glucopyranoside micelle structure in aqueous solution. **Journal of Molecular Graphics and Modeling**, v. 25, n. 1, p. 77-86, 2006.

KREILGAARD, M. Dermal pharmacokinetics of microemulsion formulations determined by *in vivo* microdialysis. **Pharmaceutical Research**, v. 18, n. 3, p. 367-373, 2001.

KREILGAARD, M. Influence of microemulsions on cutaneous drug delivery. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 54, suplemento 1, p. S77-S98, 2002.

KREILGAARD, M.; KEMME, M. J. B.; BURGGRAAF, J.; SCHOEMAKER, R. C.; COHEN, A. F. Influence of a microemulsion vehicle on cutaneous bioequivalence of a lipophilic model drug assessed by microdialysis and pharmacodynamics. **Pharmaceutical Research**, v. 18, n. 5, p. 593-599, 2001.

- KREILGAARD, M.; PEDERSEN, E. J.; JAROSZEWSKI, J. W. NMR characterisation and transdermal drug delivery potential of microemulsion systems. **Journal of Controlled Release**, v. 69, n. 3, p. 421-433, 2000.
- KTISTIS, G. A viscosity study on oil-in-water microemulsions. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 61, n. 3, p. 213-218, 1990.
- KUMARAN, A.; KARUNAKARAN, R. J. *In vitro* antioxidant activities of methanol extracts of five *Phyllanthus* species from India. **LWT – Food Science and Technology**, v. 40, n. 2, p. 344-352, 2007.
- KWEON, J. H.; CHI, S. C.; PARK, E. S. Transdermal delivery of diclofenac using microemulsions. **Archives of Pharmacal Research**, v. 27, n. 3, p. 351-356, 2004.
- LAH, J.; BESTER-ROGAC, M.; PERGER, T.-M.; VESNAZER, G. Energetics in correlation with structural features: The case of micellization. **The Journal of Physical Chemistry B**, v. 110, n. 46, p. 23279-23291, 2006.
- LATGE, P.; RICO, I.; GARELLI, R.; LATTES, A. Synthesis of long chain *N*-alkyllactylamines from unprotected lactose: A new series of nonionic surfactants. **Journal of Dispersion Science and Technology**, v. 12, n. 3-4, p. 227-237, 1991.
- LAWRENCE, M. J.; REES, G. D. Microemulsion-based media as novel drug delivery systems. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 45, n. 1, p. 89-121, 2000.
- LAZO, J. S.; QUINN, D. E. Solubilization of pulmonary angiotensin-converting enzyme with 1-*O*-*n*-octyl- β -D-glucopyranoside. **Analytical Biochemistry**, v. 102, n. 1, p. 68-71, 1980.
- LEE, B.; RICHARDS, F. M. The interpretation of protein structures: Estimation of static accessibility. **Journal of Molecular Biology**, v. 55 n. 3, p. 379-400, 1971.
- LEE, J.; LEE, Y.; KIM, J.; YOON, M.; CHOI, Y. W. Formulation of Microemulsion Systems for Transdermal Delivery of Aceclofenac. **Archives of Pharmacal Research**, v. 28, n. 9, p. 1097-1102, 2005.
- LEE, P. J.; LANGER, R.; SHASTRI, V. P. Novel microemulsion enhancer formulation for simultaneous transdermal delivery of hydrophilic and hydrophobic drugs. **Pharmaceutical Research**, v. 20, n. 2, p. 7-27, 2003.
- LEE, S. Y.; HYUN, H.; YOUN, J. Y.; KIM, B. S.; SONG, I. B.; KIM, M. S.; LEE, B.; KHANG, G.; LEE, H. B. Preparation of nano-emulsified paclitaxel using MPEG-PLGA diblock copolymers. **Colloids and Surfaces A: physicochemical and engineering aspects**, v. 131, p. 126-130, 2008.
- LEE, S.; LEE, J.; CHOI, Y. W. Design and Evaluation of Prostaglandin E₁ (PGE₁) Intraurethral Liquid Formulation Employing Self-Microemulsifying Drug Delivery System (SMEDDS) for Erectile Dysfunction Treatment. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, v. 31, n. 4, p. 668-672, 2008.

LI, L.; NANDI, I.; KIM, K. H. Development of an ethyl laurate-based microemulsion for rapid-onset intranasal delivery of diazepam. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 237, n. 1-2, p. 77-85, 2002.

LI, P.; GHOSH, A.; WAGNER, R. F.; KRILL, S.; JOSHI, Y. M.; SERAJUDDIN, A. T. M. Effect of combined use of nonionic surfactant on formation of oil-in-water microemulsions. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 288, n. 1, p. 27-34, 2005.

LINDAHL, E.; HESS, B.; VAN DER SPOEL, D. GROMACS 3.0: A package for molecular simulation and trajectory analysis. **Journal of Molecular Modeling**, v. 7, n. 8, p. 306-317, 2001.

LINDENBERG, M.; KOPP, S.; DRESSMAN, J. B. Classification of orally administered drugs on the World Health Organization Model list of Essential Medicines according to the biopharmaceutics classification system. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 58, n. 2, p. 265-278, 2004.

LIPINSKI, C. A.; LOMBARDO, F.; DOMINY, B. W.; FEENEY, P. J. Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 23, n. 1-3, p. 3-25, 1997.

LIU, Y.; ZHANG, P.; FENG, N.; ZHANG, X.; WU, S.; ZHAO, J. Optimization and in situ intestinal absorption of self-microemulsifying drug delivery system of oridonin. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 365, n. 1-2, p. 136-142, 2009.

LÓPEZ-QUINTELA, M. A. Synthesis of nanomaterials in microemulsions: formation mechanisms and growth control. **Current Opinion in Colloid and Interface Science**, v. 8, n. 2, p. 137-144, 2003.

LU, J.-L.; WANG, J.-C.; ZHAO, S.-X.; LIU, X.-Y.; ZHAO, H.; ZHANG, X.; ZHOU, S.-F.; ZHANG, Q. Self-microemulsifying drug delivery system (SMEDDS) improves anticancer effect of oral 9-nitrocamptothecin on human cancer xenografts in nude mice. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 69, n. 3, p. 899-907, 2008.

LV, F.-F.; LI, N.; ZHENG, L.-Q.; TUNG, C.-H. Studies on the stability of the chloramphenicol in the microemulsion free of alcohols. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 62, n. 3, p. 288-294, 2006.

LV, F.-F.; ZHENG, L.-Q.; TUNG, C.-H. Phase behavior of the microemulsions and the stability of the chloramphenicol in the microemulsion-based ocular drug delivery system. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 301, n. 1-2, p. 237-246, 2005.

LYONS, K. C.; CHARMAN, W. N.; MILLER, R.; PORTER, C. J. H. Factors limiting the oral bioavailability of *N*-acetylglucosaminyl-*N*-acetylmuramyl dipeptide (GMMP) and enhancement of absorption in rats by delivery in a water-in-oil microemulsion. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 199, n. 1, p. 17-28, 2000.

MACIEL, M. A. M.; CORTEZ, J. K. P. C.; GOMES, F. E. S. O gênero *Croton* e aspectos relevantes de diterpenos clerodanos. **Revista Fitos**, v. 2, n. 3, p. 54-73, 2006.

- MACIEL, M. A. M.; CUNHA, A. F.; DANTAS, T. N. C.; KAISER, C. R. NMR Characterization of Bioactive Lignans from *Phyllanthus amarus* Schum & Thorn. **Annals in Magnetic Resonance**, v. 6, n. 3, p. 76-82, 2007.
- MACIEL, M. A. M.; ANJOS, G. C.; GOMES, F. E. S.; DANTAS, T. N. C.; PINTO, A. C.; KAISER, C. R.; MIRANDA, A. F.; ECHEVARRIA, A. Estudo fitoquímico de folhas de *Croton cajucara* Benth e determinação de sua propriedade antioxidante. **Revista Fitos**, v. 4, n. 2, p. 71-89, 2009.
- MACIEL, M. A. M.; PINTO, A. C.; ARRUDA, A. C.; PAMPLONA, S. G. S. R.; VANDERLINDE, F. A.; LAPA, A. J.; ECHEVARRIA, A.; GRYNBERG, N. F.; CÔLUS, I. M. S.; FARIAS, R. A. F.; LUNA COSTA, A. M.; RAO, V. S. N. Ethnopharmacology, phytochemistry and pharmacology: a successful combination in the study of *Croton cajucara*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 70, n. 1, p. 41-55, 2000.
- MACIEL, M. A. M.; PINTO, A. C.; BRABO, S. N.; SILVA, M. N. Terpenoids from *Croton cajucara*. **Phytochemistry**, v. 49, n. 3, p. 823-828, 1998.
- MACIEL, M. A. M.; PINTO, A. C.; KAISER, C. R. NMR and structure review of some natural furoclerodanes. **Magnetic Resonance in Chemistry**, v. 41, n. 4, p.278-282, 2003.
- MACIEL, M. A. M.; PINTO, A. C.; VEIGA JR., V. F.; GRYNBERG, N. F.; ECHEVARRIA, A. Plantas medicinais: A necessidade de estudos multidisciplinares. **Química Nova**, v. 25, n. 3, p. 429-438, 2002.
- MACKERELL JR., A. D.; BASHFORD, D.; BELLOT, M.; DUNBRACK JR., R. L.; EVANSECK, J. D.; FIELD, M. J.; FISCHER, S.; GAO, J.; GUO, H.; HA, S.; JOSEPH-MCCARTHY, D.; KUCHNIR, L.; KUCZERA, K.; LAU, F. T. K.; MATTOS, C.; MICHNICK, S.; NGO, T.; NGUYEN, D. T.; PRODHOM, B.; REIHER III, W. E.; ROUX, B.; SCHLENKRICH, M.; SMITH, J. C.; STOTE, R.; STRAUB, J.; WATANABE, M.; WIÓRKIEWICZ-KUCZERA, J.; YIN, D.; KARPLUS, M. All-atom empirical potential for molecular modeling and dynamics studies of proteins. **The Journal of Physical Chemistry**, v. 102, n. 18, p. 3586-3616, 1998.
- MANDAWGADE, S. D.; SHARMA, S.; PATHAK, S.; PATRAVALE, V. B. Development of SMEDDS using natural lipophile: Application to β -Artemether delivery. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 362, n. 1-2, p. 179-183, 2008.
- MARQUES, E. F.; REGEV, O.; KHAN, A.; LINDMAN, B. Self-organization of double-chained and pseudodouble-chained surfactants: counterion and geometry effects. **Advances in Colloid and Interface Science**, v. 100-102, suplemento, p. 83-104, 2003.
- MARRINK, S. J.; TIELEMAN, D. P.; MARK, A. E. Molecular dynamics simulation of the kinetics of spontaneous micelle formation. **The Journal of Physical Chemistry B**, v. 104, n. 51, p. 6380-6388, 2000.
- MEI, Z.; CHEN, H.; WENG, T.; YANG, Y.; YANG, X. Solid lipid nanoparticle and microemulsion for topical delivery of triptolide. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 56, n. 2, p. 189-196, 2003.

- MENGER, F. M.; LITTAU, C. A. Gemini Surfactants: Synthesis and Properties. **Journal of the American Chemical Society**, v. 113, n. 4, p. 1451-1452, 1991.
- MENSOR, L. L.; MENEZES, F. S.; LEITÃO, G. G.; REIS, A. S.; SANTOS, T. C.; COUBE, C. S.; LEITÃO, S. G. Screening of Brazilian plant extracts for antioxidant activity by the use of DPPH free radical method. **Phytotherapy Research**, v. 15, n. 2, p. 127-130, 2001.
- MOMOT, K. I.; KUCHEL, P. W. Pulsed Field Gradient Nuclear Magnetic Resonance as a Tool for Studying Drug Delivery Systems. **Concepts in Magnetic Resonance Part A**, v. 19A, n. 2, p. 51-64, 2003.
- MORENO, M. A.; BALLESTEROS, M. P.; FRUTOS, P. Lecithin-based oil-in-water microemulsions for parenteral use: pseudoternary phase diagrams, characterization and toxicity studies. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 92, n. 7, p. 1428-1437, 2003.
- MORENO, M. A.; FRUTOS, P.; BALLESTEROS, M. P. Lyophilized lecithin based oil-water microemulsions as a new and low toxic delivery system for amphotericin B. **Pharmaceutical Research**, v. 18, n. 3, p. 344-351, 2001.
- MORGON, N. H.; COUTINHO, K. **Métodos de Química Teórica e Modelagem Molecular**. São Paulo: Editora Livraria da Física, 2007.
- MOULIK, S. P.; PAUL, B. K. Structure, dynamics and transports properties of microemulsions. **Advances in Colloid and Interface Science**, v. 78, n. 2, p. 99-195, 1998.
- NAGARAJAN, R.; RUCKENSTEIN, E. Theory of Surfactant Self-Assembly: A Predictive Molecular Thermodynamic Approach. **Langmuir**, v. 7, n. 12, p. 2934-2969, 1991.
- NARANG, A. S.; DELMARRE, D.; GAO, D. Stable drug encapsulation in micelles and microemulsions. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 345, n. 1-2, p. 9-25, 2007.
- NEUBERT, R. H. H.; SCHMALFUB, U.; WOLF, R.; WOHLRAB, W. A. Microemulsions as colloidal vehicle systems for dermal drug delivery. Part V: microemulsions without and with glycolipid as penetration enhancer. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 94, n. 4, p. 821-827, 2005.
- NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M. Natural Products as Sources of New Drugs over the Last 25 Years. **Journal of Natural Products**, v. 70, n. 3, p. 461-477, 2007.
- NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M.; SNADER, K. M. The influence of natural products upon drug discovery. **Natural Products Reports**, v. 17, n. 3, p. 215-234, 2000.
- NINHAM, B. W.; EVANS, D. F.; WEI, G. J. The curious world of hydroxide surfactants. Spontaneous vesicles and anomalous micelles. **The Journal of Physical Chemistry**, v. 87, n. 24, p. 5020-5025, 1983.
- ODAHARA, T. Stability and solubility of integral membrane proteins from photosynthetic bacteria solubilized in different detergents. **Biochimica et Biophysica Acta: biomembranes**, v. 1660, n. 1, p. 80-92, 2004.

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. **Química Nova**, v. 27, n. 1, p. 131-138, 2004.

OLIVEIRA, M. C. K.; LUCAS, E. F.; GONZALEZ G.; OLIVEIRA, J. F. Heavy oil fraction removal from sand using hydrotropes containing oil-in-water microemulsions. **Progress in Colloid and Polymer Science**, v. 128, p. 288-292, 2004.

PAOLINO, D.; VENTURA, C. A.; NISTICÒ, S.; PUGLISI, G.; FRESTA, M. Lecithin microemulsions for the topical administration of ketoprofen: percutaneous adsorption through human skin and *in vivo* human skin tolerability. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 244, n. 1-2, p. 21-31, 2002.

PARK, E. S.; CUI, Y.; YUN, B. J.; KO, I. J.; CHI, S. C. Transdermal delivery of piroxicam using microemulsions. **Archives of Pharmacal Research**, v. 28, n. 2, p. 243-248, 2005.

PARK, K.-M.; KIM, C.-K. Preparation and evaluation of flurbiprofen-loaded microemulsion for parenteral delivery. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 181, n. 2, p. 173-179, 1999.

PARK, K.-M.; LEE, M.-K.; HWANG, K.-J.; KIM, C.-K. Phospholipid-based microemulsions of flurbiprofen by the spontaneous emulsification process. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 183, n. 2, p. 145-154, 1999.

PATEL, A. R.; VAVIA, P. R. Preparation and *in vivo* evaluation of SMEDDS (Self-Microemulsifying Drug Delivery System) containing fenofibrate. **The AAPS Journal**, v. 9, n. 3, p. E344-E352, 2007. Disponível em: <<http://www.springerlink.com/content/m2614m3134526l20/fulltext.pdf>>. Acesso em: 12 fev. 2009.

PAULA, S.; SÜS, W.; TUCHTENHAGEN, J.; BLUME, A. Thermodynamics of micelle formation as a function of temperature: A high sensitivity titration calorimetry study. **Journal of Physical Chemistry**, v. 99, n.30, p. 11742-11751, 1995.

PAX, F.; HOFFMANN, H. **Euphorbiaceae**. In: Engler, A; Prantl, K. (org.) Die natürlichen pflanzenfamilien, 2.ed. 19C, Leipzig: Engelmann, p. 11-23, 1931.

PECK, D. G.; SCHECHTER, R. S.; JOHNSTON, K. P. Unified classical and molecular thermodynamic theory of spherical water-in-oil microemulsions. **The Journal of Physical Chemistry**, v. 95, n. 23, p. 9541-9549, 1991.

PELTOLA, S.; SAARINEN-SAVOLAINEN, P.; KIESVAARA, J.; SUHONEN, T. M.; URTTI, A. Microemulsions for topical delivery of estradiol. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 254, n. 2, p. 99-107, 2003.

PESTMAN, J. M.; KEVELAM, J.; BLANDAMER, M. J.; VAN DOREN, H. A.; KELLOGG, R. M.; ENGBERTS, J. B. F. N. Thermodynamics of micellization of nonionic saccharide-based *N*-acyl-*N*-alkylaldosylamine and *N*-acyl-*N*-alkylamino-1-deoxyalditol surfactants, **Langmuir**, v. 15, n. 6, p. 2009-2014, 1999.

PODLOGAR, F.; GASPERLIN, M.; TOMSIC, M.; JAMNIK, A.; ROGAC, M. B. Structural characterization of water-Tween 40[®]/Imwitor 308[®]-isopropyl myristate microemulsions using different experimental methods. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 276, n. 1-2, p. 115-128, 2004.

PODLOGAR, F.; ROGAC, M. B.; GASPERLIN, M. The effect of internal structure of selected water-Tween 40[®]-Imwitor 308[®]-IPM microemulsions on ketoprofene release. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 302, n. 1-2, p. 68-77, 2005.

PORRAS, M.; SOLANS, C.; GONZÁLEZ, C.; MARTÍNEZ, A.; GUINART, A.; GUTIÉRREZ, J. M. Studies of formation of W/O nano-emulsions. **Colloids and Surfaces A: physicochemical and engineering aspects**, v. 249, n. 1-3, p. 115-118, 2004.

PORTER, C. J. H.; KAUKONEN, A. M.; BOYD, B. J.; EDWARDS, G. A.; CHARMAN, W. N. Susceptibility to lipase-mediated digestion reduces the oral bioavailability of danazol after administration as a medium-chain lipid-based microemulsion formulation. **Pharmaceutical Research**, v. 21, n. 8, p. 1405-1412, 2004.

POUTON, C.W. Formulation of self-emulsifying drug delivery systems. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 25, n. 1, p. 47-58, 1997.

RADOMSKA, A.; DOBRUCKI, R. The use of some ingredients for microemulsion preparation containing retinol and its esters. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 196, n. 2, p. 131-134, 2000.

RAKITIN, A. R.; PACK, G. R. Molecular dynamics simulations of ionic interactions with dodecyl sulfate micelles. **The Journal of Physical Chemistry B**, v. 108, n. 8, p. 2712-2716, 2004.

RHEE, Y.-S.; CHOI, J.-G.; PARK, E.-S.; CHI, S.-C. Transdermal delivery of ketoprofen using microemulsions. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 228, n. 1-2, p. 161-170, 2001.

RICHTER, T.; KEIPERT, S. *In vitro* permeation studies comparing bovine nasal mucosa, porcine cornea and artificial membrane: adrostenedione in microemulsions and their components. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 58, n. 1, p. 137-143, 2004.

RODRIGUES, D. G.; MARIA, D. A.; FERNANDES, D. C.; VALDUGA, C. J.; COUTO, R. D.; IBAÑEZ, O. C. M.; MARANHÃO, R. C. Improvement of paclitaxel therapeutic index by derivatization and association to a cholesterol-rich microemulsion: *in vitro* and *in vivo* studies. **Cancer Chemotherapy and Pharmacology**, v. 55, n. 6, p. 565-576, 2005.

ROSSI, C. G. F. T.; DANTAS, T. N. C.; DANTAS NETO, A. A.; MACIEL, M. A. M. Tensoativos: Uma abordagem básica e perspectivas para aplicabilidade industrial. **Revista Universidade Rural: série ciências exatas e da terra, Seropédica, RJ**, v. 25, n.1-2, p.59-71, 2006.

- RUCKENSTEIN, E.; NAGARAJAN, R. Critical micelle concentration. A transition point for micellar size distribution. **The Journal of Physical Chemistry**, v. 79, n. 24, p. 2622-2626, 1975.
- RUTH, H. S.; ATTWOOD, D.; KTISTIS, G.; TAYLOR, C. J. Phase studies and particle size analysis of oil-in-water phospholipid microemulsions. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 116, n. 2, p. 253-261, 1995.
- RYCKAERT, J.-P.; CICCOTTI, G.; BERENDSEN, H. J. C. Numerical integration of the cartesian equations of motion of a system with constraints: Molecular dynamics of *n*-alkanes. **Journal of Computational Physics**, v. 23, n. 3, p. 327-341, 1997.
- SAN GIL, R. A. S.; ALBUQUERQUE, M. G.; ALENCASTRO, R. B.; PINTO, A. C.; GOMES, F. E. S.; DANTAS, T. N. C.; MACIEL, M. A. M. Solid-state ¹³C NMR and molecular modeling studies of acetyl aleuritic acid obtained from *Croton cajucara* Benth. **Journal of Molecular Structure**, v. 885, n. 1-3, p. 82-88, 2008.
- SARCIAUX, J. M.; ACAR, L.; SADO, P. A. Using microemulsion formulations for oral drug delivery of therapeutic peptides. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 120, n. 2, p. 127-136, 1995.
- SCHMALFUB, U.; NEUBERT, R.; WOHLRAB, W. Modification of drug penetration into human skin using microemulsions. **Journal of Controlled Release**, v. 46, n. 3, p. 279-285, 1997.
- SCHULMAN, J. H.; STOECKENIUS, W.; PRINCE, L. M. Mechanism of formation and structure of micro emulsions by electron microscopy. **The Journal of Physical Chemistry**, v. 63, n. 10, p. 1677-1680, 1959.
- SHUKLA, A.; JANICH, M.; JAHN, K.; KRAUSE, A.; KISELEV, M. A.; NEUBERT, R. H. H. Investigation of Pharmaceutical Oil/Water Microemulsions by Small-Angle Scattering. **Pharmaceutical Research**, v. 19, n. 6, p. 881-886, 2002.
- SHUKLA, A.; JANICH, M.; JAHN, K.; NEUBERT, R. H. H. Microemulsions for Dermal Drug Delivery Studied by Dynamic Light Scattering: Effect of Interparticle Interactions in Oil-in-Water Microemulsions. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 92, n. 4, p. 730-738, 2003.
- SHUKLA, A.; NEUBERT, R. H. H. Diffusion behavior of pharmaceutical O/W microemulsions studied by dynamic light scattering. **Colloid Polymer Science**, v. 284, n. 5, p. 568-573, 2006.
- SILVA, S; TASSARA, H. **Frutas do Brasil**. 4. ed. São Paulo: Empresa das Artes, 1996.
- SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L.; PETROVICK, P. R. **Farmacognosia: da Planta ao Medicamento**, 5.ed. Porto Alegre/Florianópolis: Editora da UFSC/Editora UFRGS, 2004.

SINGH, A. K.; CHAURASIYA, A.; SINGH, M.; UPADHYAY, S. C.; MUKHERJEE, R.; KHAR, R. K. Exemestane Loaded Self-Microemulsifying Drug Delivery System (SMEDDS): Development and Optimization. **AAPS PharmSciTech**, v. 9, n. 2, p. 628-634, 2008.

SINTOV, A. C.; BOTNER, S. Transdermal drug delivery using microemulsion and aqueous systems: influence of skin storage conditions on the *in vitro* permeability of diclofenac from aqueous vehicles systems. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 311, n. 1-2, p. 55-62, 2006.

SINTOV, A. C.; BRANDYS-SITTON, R. Facilitated skin penetration of lidocaine: combination of a short-term iontophoresis and microemulsion formulation. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 316, n. 1-2, p. 58-67, 2006.

SINTOV, A. C.; SHAPIRO, L. New microemulsion vehicle facilitates percutaneous penetration *in vitro* and cutaneous drug bioavailability *in vivo*. **Journal of Controlled Release**, v. 95, n. 2, p. 173-183, 2004.

SKAF, M. S.; STELL, G. Thermodynamical, structural, and clustering properties of a microemulsion model. **The Journal of Chemical Physics**, v. 97, n. 10, p. 7699-7715, 1992.

SÖDERLIND, E.; WOLLBRATT, M.; VON CORSWANT, C. The usefulness of sugar surfactants as solubilizing agents in parenteral formulations. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 252, n. 1-2, p. 61-71, 2003.

SOEJARTO, D. D.; FARNSWORTH, N. R. Tropical rain forests: potential sources of new drugs? **Perspectives in Biology and Medicine**, v. 32, n. 2, p. 244-256, 1989. [ref.2 QN]

SOUZA, M. A. A.; SOUZA, S. R.; VEIGA JR., V. F.; CORTEZ, J. K. P. C.; LEAL, R. S.; DANTAS, T. N. C.; MACIEL, M. A. M. Composição química do óleo fixo de *Croton cajucara* e determinação de suas propriedades fungicidas. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 16, suplemento 1, p. 599-610, 2006.

SPICLIN, P.; HOMAR, M.; ZUPANCIC-VALANT, A.; GASPERLIN, M. Sodium ascorbyl phosphate in topical microemulsions. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 256, n. 1-2, p. 65-73, 2003.

STRICKLEY, R. G. Solubilizing excipients in oral and injectable formulations. **Pharmaceutical Research**, v. 21, n. 2, p. 201-230, 2004.

SUBRAMANIAN, N.; RAY, S.; GHOSAL, S. K.; BHADRA, R.; MOULIK, S. P. Formulation design of self-microemulsifying drug delivery systems for improved oral bioavailability of celecoxib. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, v. 27, n. 12, p. 1993-1999, 2004.

SVENSON, S. Controlling surfactant self-assembly. **Current Opinion in Colloid and Interface Science**, v. 9, n. 3-4, p. 201-212, 2004.

TALHOUT, R.; ENGBERTS, J. B. F. N. Self-assembly in mixtures of sodium alkyl sulfates and alkyltrimethylammonium bromides: aggregation behavior and catalytic properties. **Langmuir**, v. 13, n. 19, p. 5001-5006, 1997.

TANFORD, C. **The hydrophobic effect: formation of micelles and biological membranes**. 2. ed. Nova Iorque: Wiley, 1980. 68 p.

TEREK, M. C.; KARABULUT, B.; SELVI, N.; AKMAN, L.; KARASULUS, Y.; OZGUNEY, I.; SANLI, A. U.; USLU, R.; OZSARAN, A. Arsenic trioxide-loaded, microemulsion-enhanced cytotoxicity on MDAH 2774 ovarian carcinoma cell line. **International Journal of Gynecological Cancer**, v. 16, n. 2, p. 532-537, 2006.

THACHARODI, D.; RAO, K. P. Transdermal absorption of nifedipine from microemulsions of lipophilic skin penetration enhancers. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 111, n. 3, p. 235-240, 1994.

TIELEMAN, D. P.; VAN DER SPOEL, D.; BERENDSEN, H. J. C. Molecular dynamics simulations of dodecylphosphocholine micelles at three different aggregate sizes: Micellar structure and chain relaxation. **The Journal of Physical Chemistry B**, v. 104, n. 27, p. 6380-6388, 2000.

TOMSIC, M.; PODLOGAR, F.; GASPERLIN, M.; ROGAC, M. B.; JAMNIK, A. Water-Tween 40[®]/Imwitor 308[®]-isopropyl myristate microemulsions as delivery systems for ketoprofen: Small-angle X-ray scattering study. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 327, n. 1-2, p. 170-177, 2006.

TREVISAN, M. T. S.; PFUNDSTEIN, B.; HAUBNER, R.; WUERTELE, G.; SPIEGELHALDER, B.; BARTSCH, H.; OWEN, R. W. Characterization of alkyl phenols in cashew (*Anacardium occidentale*) products and assay of their antioxidant capacity. **Food and Chemical Toxicology**, v. 44, n. 2, p. 188-197, 2006.

TROTTA, M.; PATTARINO, F.; GASCO, M. R. Influence of counter ions on the skin permeation of methotrexate from water-oil microemulsions. **Pharmaceutica Acta Helvetica**, v. 71, n. 2, p. 135-140, 1996.

VALENTA, C.; SCHULTZ, K. Influence of carrageenan on the rheology and skin permeation of microemulsion formulations. **Journal of Controlled Release**, v. 95, n. 2, p. 257-265, 2004.

VANDAMME, T. F. Microemulsions as ocular drug delivery systems: recent developments and future challenges. **Progress in Retinal Eye Research**, v. 21, n. 1, p. 15-34, 2002.

VINSON, P. K.; SHEEHAN, J. G.; MILLER, W. G.; SCRIVEN, L. E.; DAVIS, H. T. Viewing Microemulsions with Freeze-Fracture Transmission Electron Microscopy. **The Journal of Physical Chemistry**, v. 95, n. 6, p. 2546-2550, 1991.

VOLLMER, D. How to calculate phase diagrams for microemulsions – a simple rule. **Fett/Lipid**, v. 101, n. 10, p. 379-388, 1999.

VON CORSWANT, C.; THORÉN, P.; ENGSTRÖM, S. Triglyceride-based microemulsion for intravenous administration of sparingly soluble substances. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 87, n. 2, p. 200-208, 1998.

VON RYBINSKI, W.; HILL, K. Alkyl polyglycosides: Properties and applications of a new class of surfactants. **Angewandte Chemie: international edition**, v. 37, n. 10, p. 1328-1345, 1998.

VYAS, T. K.; BABBAR, A. K.; SHARMA, R. K.; SINGH, S.; MISRA, A. Intranasal mucoadhesive microemulsions of clonazepam: preliminary studies on brain targeting. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 95, n. 3, p. 570-580, 2006.

VYAS, T. K.; BABBAR, A. K.; SHARMA, R. K.; SINGH, S.; MISRA, A. Intranasal mucoadhesive microemulsions of zolmitriptan: preliminary studies on brain-targeting. **Journal of Drug Targeting**, v. 13, n. 5, p. 317-324, 2005.

VYAS, T. K.; BABBAR, A. K.; SHARMA, R. K.; SINGH, S.; MISRA, A. Preliminary brain-targeting studies on intranasal mucoadhesive microemulsion of sumatriptan. **AAPS PharmSciTech**, v. 7, n. 1, p. E1-E9, 2006. Disponível em: <<http://www.springerlink.com/content/dqq3118245g8h7j7/fulltext.pdf>>. Acesso em: 06 jul. 2006.

WALTON, J.; TIDDY, G. J. T.; WEBB, S. J. Synthesis and lyotropic phase behavior of novel nonionic surfactants for the crystallization of integral membrane proteins. **Tetrahedron Letters**, v. 47, n. 5, p. 737-741, 2006.

WANG, J.; WANG, W.; KOLLMAN, P. A.; CASE, D. A. Automatic atom type and bond type perception in molecular mechanical calculations. **Journal of Molecular Graphics and Modeling**, v. 25, n. 2, p. 247-260, 2006.

WARISNOICHAROEN, W.; LANSLEY, A. B.; LAWRENCE, M. J. Nonionic oil-in-water microemulsions: the effect of oil type on phase behaviour. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 198, n. 1, p. 7-27, 2000.

WOO, J. S.; KIM, T.-S.; PARK, J.-H.; CHI, S.-C. Formulation and Biopharmaceutical Evaluation of Silymarin Using SMEDDS. **Archives of Pharmacal Research**, v. 30, n. 1, p. 82-89, 2007.

WOO, J. S.; SONG, Y.-K.; HONG, J.-Y.; LIM, S.-J.; KIM, C.-K. Reduced food-effect and enhanced bioavailability of a self-microemulsifying formulation of itraconazole in healthy volunteers. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 33, n. 2, p. 159-165, 2008.

WOODS GROUP. **GLYCAM**. Complex Carbohydrate Research Center, The University of Georgia, Athens, GA, 2007.

WRIGHT, C. I.; VAN-BUREN, L.; KRONER, C. I.; KONING, M. M. G. Herbal medicines as diuretics: A review of the scientific evidence. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 114, n. 1, p. 1-31, 2007.

WU, W.; WANG, Y.; QUE, L. Enhanced bioavailability of silymarin by self-microemulsifying drug delivery system. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 63, n. 3, p. 288-294, 2006.

YANG, J. H.; KIM, Y. I.; KIM, K. M. Preparation and evaluation of aceclofenac microemulsion for transdermal drug delivery system. **Archives of Pharmacal Research**, v. 25, n. 4, p. 534-540, 2002.

YANG, S.; GURSOY, R. N.; LAMBERT, G.; BENITA, S. Enhanced oral absorption of paclitaxel in a novel self-microemulsifying drug delivery system with or without concomitant use of P-glycoprotein inhibitors. **Pharmaceutical Research**, v. 21, n. 2, p. 261-270, 2004.

YI, T.; WAN, J.; XU, H.; YANG, X. A new solid self-microemulsifying formulation prepared by spray-drying to improve the oral bioavailability of poorly water soluble drugs. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 70, n. 2, p. 439-444, 2008.

YIN, Y.M.; CUI, F.-D.; MU, C.-F.; CHOI, M.-K.; KIM, J. S.; CHUNG, S.-J.; SHIM, C.-K.; KIM, D.-D. Docetaxel microemulsion for enhanced oral bioavailability: Preparation and *in vitro* and *in vivo* evaluation. **Journal of Controlled Release**, v. 140, n. 2, p. 86-94, 2009.

ZHANG, L.; SUN, X.; ZHANG, Z.-R. An investigation on liver-targeting microemulsions of norcantharidin. **Drug Delivery: journal of the delivery and targeting of therapeutic agents**, v. 12, n. 5, p. 289-295, 2005.

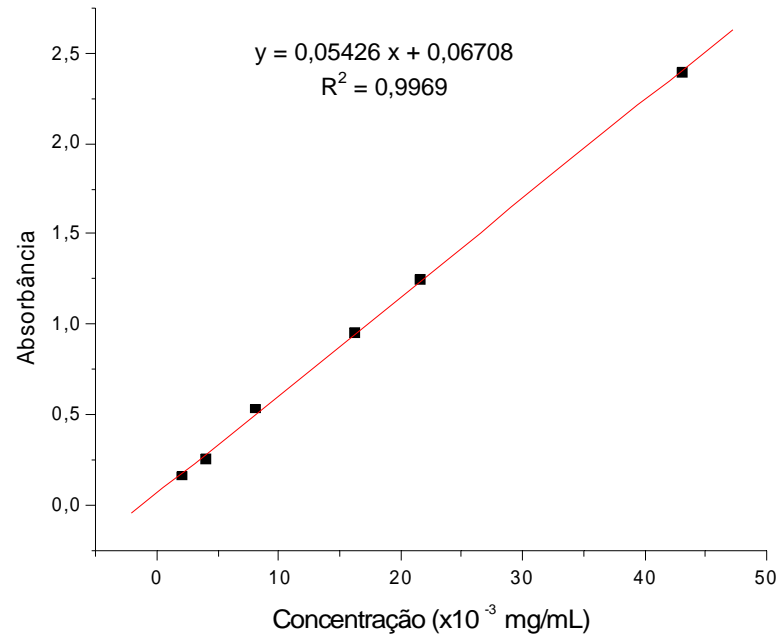
ZHANG, P.; LIU, Y.; FENG, N.; XU, J. Preparations and evaluation of self-microemulsifying drug delivery system of oridonin. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 355, n. 1-2, p. 269-276, 2008.

ZHANG, Q.; JIANG, X.; JIANG, W.; LU, W.; SU, L.; SHI, Z. Preparation of nimodipine-loaded microemulsion for intranasal delivery and evaluation on the targeting efficiency to the brain. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 275, n. 1-2, p. 85-96, 2004.

ZHENG, J. Y.; FULU, M.-Y. Decrease of genital organs weights and plasma testosterone levels in rats following oral administration of leuprolide microemulsion. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 307, n. 2, p. 209-215, 2006.

Anexos

ANEXO A – Curva de Calibração da DCTN para testes de solubilidade por espectroscopia no UV-Vísível



ANEXO B – Gráficos de comportamento reológico tensão (τ) x taxa de cisalhamento ($\dot{\gamma}$)