



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA ORGÂNICA E INORGÂNICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

LOUHANA MOREIRA REBOUÇAS

**NANOEMULSÕES À BASE DE ÁCIDO BETULÍNICO E ÓLEO DE LINHAÇA: UMA
PROPOSTA PARA O TRATAMENTO DE CARCINOMA COLORRETAL**

FORTALEZA

2019

LOUHANA MOREIRA REBOUÇAS

NANOEMULSÕES À BASE DE ÁCIDO BETULÍNICO E ÓLEO DE LINHAÇA: UMA
PROPOSTA PARA O TRATAMENTO CARCINOMA COLORRETAL

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal do Ceará como requisito parcial à obtenção do Título de Mestre em Química. Área de concentração: Química.

Orientadora: Profa. Dra. Nágila Maria Pontes Silva Ricardo.

Coorientadora: Profa. Dra. Nilce Viana Gramosa Pompeu de Sousa Brasil.

FORTALEZA

2019

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Biblioteca Universitária

Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

- R24n Rebouças, Louhana Moreira.
 Nanoemulsões à base de ácido betulínico e óleo de linhaça : Uma proposta para o tratamento de carcinoma colorretal / Louhana Moreira Rebouças. – 2019.
 106 f. : il. color.
- Tese (doutorado) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências, Programa de Pós-Graduação em Química, Fortaleza, 2019.
 Orientação: Profa. Dra. Nágila Maria Pontes Silva Ricardo.
 Coorientação: Prof. Dr. Nilce Viana Gramosa Pompeu de Sousa Brasil.
1. Ácido betulínico. 2. Nanoemulsão. 3. Óleo de linhaça. 4. Pluronic F127. 5. HCT-116. I. Título.
 CDD 540
-

LOUHANA MOREIRA REBOUÇAS

NANOEMULSÕES À BASE DE ÁCIDO BETULÍNICO E ÓLEO DE LINHAÇA: UMA
PROPOSTA PARA O TRATAMENTO DE CARCINOMA COLORRETAL

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal do Ceará como requisito parcial à obtenção do Título de Mestre em Química. Área de concentração: Química.

Aprovada em: ____/____/____

BANCA EXAMINADORA

Prof^a. Dr^a. Nágila Maria Pontes Silva Ricardo (Orientadora)

Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof^a. Dr^a. Tamara Gonçalves de Araújo

Universidade Federal do Ceará (UFC)

Dr^a. Fátima de Cássia Evangelista de Oliveira

Universidade Federal do Ceará (UFC)

A Deus.

Aos meus pais.

Aos meus filhos Thiago e Kahlel e ao meu
esposo Carlos Helder.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus por tudo.

A todos meus familiares que torceram por mim e contribuíram de um modo ou outro para tornar menos difícil a ausência do lar. Especialmente, aos meus filhos, aos meus pais, a minha sogra Cilene e ao meu esposo.

Aos colegas do LABPIM, em especial a amiga Ethanielda, Rafael, Aierta, Camila e Arcelina pela colaboração em alguns experimentos e contribuições.

Ao LAFIPLAM III, pela acomodação e infraestrutura disponibilizada.

Ao CENAUREMN, pela realização das análises de Ressonância Magnética Nuclear.

Ao Guilherme e a Lorena da EMBRAPA pela colaboração na execução das análises de CG-EM.

Ao professor Rinaldo e ao amigo Lukas Angelim do IFCE Campus Fortaleza, pelo apoio na realização de alguns experimentos.

Aos meus queridos amigos do IFCE Campus Maracanaú, Emília e Aristênio Mendes pela amizade sincera e pelo apoio durante a realização deste trabalho.

Aos bolsistas Júlio Cesar, Kelyne e Thiago (meu filho) do Laboratório de Química Orgânica e Inorgânica do IFCE Campus Maracanaú pela ajuda na realização de alguns experimentos.

À Célia da secretaria, pela paciência e prestatividade.

Ao Laboratório de Oncologia Experimental, especialmente a Cassia de Fátima pela preciosa e muito importante ajuda na realização dos testes de atividade antiproliferativa.

A professora Tamara Gonçalves pelo apoio, disponibilidade e valiosas contribuições.

As minhas orientadoras professoras Nágila e Nilce pela confiança, compreensão, pelos ensinamentos, pelo aprendizado e pela oportunidade de realizar este trabalho. Tenho uma eterna gratidão a vocês!

E a todos que me ajudaram de alguma forma e que não foram citados.

“Ser obrigado a trabalhar, e obrigado a fazer o melhor possível, cria em você moderação e autocontrole, diligência e força de vontade, ânimo e satisfação, e cem outras virtudes que o preguiçoso nunca conhecerá.” (CHARLES KINGSLEY)

RESUMO

O ácido betulínico é um triterpeno pentacíclico altamente promissor como agente antineoplásico, no entanto este composto apresenta algumas limitações no que se refere à sua baixa solubilidade em meio aquoso, o que restringe a sua aplicação. Porém, uma nova forma de veiculação como as nanoemulsões são relatadas para solucionar essa problemática relacionada a fármacos hidrofóbicos. O presente trabalho tem como objetivo formular e caracterizar nanoemulsões contendo óleo de linhaça e ácido betulínico estabilizadas com Pluronic F127 e PGPR e testá-las quanto a sua citotoxicidade frente a linhagens de células HL-60 (leucemia), HCT-116 (carcinoma colorretal), NCI-H460 (carcinoma pulmonar), SNB-19 (glioblastoma) e em L-929 (fibroblastos normais) e aplicá-las na formulação de um supositório retal. Os resultados obtidos no estudo reológico identificaram o comportamento pseudoplástico das formulações. O estudo de estabilidade caracterizou as nanoemulsões como estáveis, com pH levemente ácido e indicativo de prazo de validade provisório de 24 meses. Através de um estudo para identificar o BHL requerido pelo óleo de linhaça duas nanoemulsões mais estáveis foram selecionadas, a formulação FF, com BHL 22, contendo somente como tensoativo o Pluronic F127 e a formulação FP, com BHL 12, contendo além do Pluronic F127, o PGPR. Os valores de diâmetro médio de partícula encontram-se na faixa de 219 nm e 221 nm, índice de polidispersão de 0,118 e 0,105 e potencial zeta de -36,5, e -43,4 mV para as emulsões FF e FP, respectivamente. Os dados de índice de polidispersão caracterizaram as nanoemulsões com distribuição do tamanho de partícula moderadamente polidispersa. As emulsões FF e FP obtiveram Eficiência de Encapsulação (EE) acima de 99,99 %. Quanto a atividade citotóxica as formulações FF e FP não se mostraram citotóxicas frente a células L-929 (fibroblastos normais) enquanto o ativo não encapsulado apresentou-se citotóxico. As formulações apresentaram atividade citotóxica em todas as linhagens tumorais testadas com maior efetividade frente a células de HCT-116 (carcinoma colorretal). Os supositórios formulados apresentaram peso médio de 3,25 g e 3,23 g e cinética de dissolução *in vitro* de acordo com o modelo matemático de Higuchi.

Palavras-chave: Ácido betulínico. Nanoemulsão. Óleo de linhaça. Pluronic F127. HCT-116.

ABSTRACT

Betulinic acid is a highly promising pentacyclic triterpene as an antineoplastic agent, however this compound presents some limitations with regard to its low solubility in aqueous medium, which restricts its application. However, a new form of delivery such as nanoemulsions have been reported to solve this problem related to hydrophobic drugs. The aim of the present work was to formulate and characterize nanoemulsions containing flaxseed oil and betulinic acid stabilized with Pluronic F127 and PGPR and to test them for cytotoxicity against HL-60 (leukemia), HCT-116 (colorectal carcinoma), NCI-H460 (pulmonary carcinoma), SNB-19 (glioblastoma) and L929 (normal fibroblasts) and apply them in the formulation of a rectal suppository. The results obtained in the rheological study identified the pseudoplastic behavior of the formulations. The stability study characterized the nanoemulsions as stable, with slightly acid pH and indicative of provisional shelf life of 24 months. Through a study to identify the HLB required by flaxseed oil two more stable nanoemulsions were selected, the FF, with BHL 22, formulation containing only as tensoactive Pluronic F127 and the FP formulation, with BHL 12, containing in addition to Pluronic F127, PGPR. The mean particle diameter values are in the range of 219 nm and 221 nm, polydispersity index of 0.118 and 0.105 and zeta potential of -36.5 and -43.4 mV for the FF and FP emulsions, respectively. The polydispersity index data characterized the moderately polydisperse particle size distribution nanoemulsions. The FF and FP emulsions obtained Encapsulation Efficiency (EE) above 99.9%. As for cytotoxic activity, the FF and FP formulations were not cytotoxic against L929 cells (normal fibroblasts) while the non-encapsulated active was cytotoxic. The formulations showed cytotoxic activity in all tumor lines tested most effectively against HCT-116 cells (colorectal carcinoma). The formulated suppositories presented a mean weight of 3.25 g and 3.23 g and dissolution kinetics in vitro according to the mathematical model of Higuchi.

Keywords: Betulinic acid. Nanoemulsion. Flaxseed oil. Pluronic F127. HCT-116 .

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Câncer colorretal em diferentes estágios	21
Figura 2 – Tipos de emulsões quanto a composição das fases	22
Figura 3 – Mecanismos físicos de desestabilização de emulsões	25
Figura 4 – Estrutura química do ácido betulínico	27
Figura 5 – Estruturas químicas dos ácidos graxos ômega 3, 6 e 9	28
Figura 6 – Estrutura do Pluronic F127	30
Figura 7 – Estrutura química do PGPR	31
Figura 8 – Anatomia arterial do intestino	32
Figura 9 – Esquema representativo da transesterificação do óleo de linhaça	40
Figura 10 – Esquema representativo do preparo das nanoemulsões	46
Figura 11 – Esquema representativo da determinação da EE	50
Figura 12 – Diagrama esquemático do procedimento do teste do MTT	52
Figura 13 – Esquema representativo do procedimento de preparo dos supositórios	54
Figura 14 – Esquema representativo do ensaio de dissolução dos supositórios	55
Figura 15 - Cromatograma CG-DIC dos ésteres metílicos do óleo de linhaça	56
Figura 16 – Espectro de FTIR do óleo de linhaça	57
Figura 17 – Espectro de RMN ¹ H do ácido betulínico	62
Figura 18 – Espectro de RMN ¹³ C do ácido betulínico	64
Figura 19 – Espectro de FTIR do ácido betulínico	66
Figura 20 – Valores de diâmetro <i>versus</i> BHL das emulsões	68
Figura 21 – Nanoemulsões FF e FP preparadas	71
Figura 22 – Diagrama de distribuição das espécies do ácido betulínico	72
Figura 23 – Curva analítica para o ácido betulínico	74

Figura 24 – Imagens de MET das nanoemulsões FF e FP	77
Figura 25 – Variação do PZ a 25 °C e 45 °C	78
Figura 26 – Variação do tamanho de partícula a 25 °C e 45 °C	78
Figura 27 - Variação do PDI a 25 °C e 45 °C	79
Figura 28 - Variação do pH a 25 °C e 45 °C	80
Figura 29 - Variação do percentual do ativo a 25 °C e 45 °C	80
Figura 30 – Curvas de tensão em função da taxa de cisalhamento à 25 °C	81
Figura 31 - Curvas de viscosidade em função da taxa de cisalhamento à 25 °C	81
Figura 32 – Gráficos de % de inibição L-929 <i>versus</i> concentração	85
Figura 33 – Gráficos de % de inibição HCT-116 <i>versus</i> concentração	86
Figura 34 – Gráficos de % de inibição NCI-H460 <i>versus</i> concentração	87
Figura 35 – Gráficos de % de inibição SNB-119 <i>versus</i> concentração	88
Figura 36 – Gráficos de % de inibição HL-60 <i>versus</i> concentração	89
Figura 37 – Supositórios preparados com as nanoemulsões	93
Figura 38 – Gráfico de % de ácido betulínico liberado <i>versus</i> tempo	95
Figura 39 – Gráfico do log f <i>versus</i> log do tempo	95
Figura 40 – Gráfico de % f <i>versus</i> raiz quadrada do tempo	96

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Linhagens celulares utilizadas na avaliação da citotoxicidade	37
Tabela 2 – Quantidade de tensoativos e BHL resultantes	43
Tabela 3 – Formulações das nanoemulsões FF e FP	45
Tabela 4 – Perfil de ácidos graxos do óleo de linhaça extraído	56
Tabela 5 – Atribuições das principais bandas no infravermelho do óleo de linhaça	58
Tabela 6 – Resultados das análises físico-químicas do óleo de linhaça	59
Tabela 7 – Dados dos espectros de RMN ¹ H do ácido betulínico	60
Tabela 8 – Dados dos espectros de RMN ¹³ C do ácido betulínico	65
Tabela 9 – Atribuições das principais bandas no infravermelho do ácido betulínico	67
Tabela 10 – Resultados de PZ, PDI e resistência ao estresse mecânico	69
Tabela 11 – Resultados da caracterização das formulações FF e FP	71
Tabela 12 – Resultados do teste ANOVA em um nível de significância de 0,05	75
Tabela 13 – Resultados de LD e LQ	75
Tabela 14 – Valores obtidos do ajuste ao modelo Lei da Potência	82
Tabela 15 – Atividade citotóxica após 72 horas de incubação	84
Tabela 16 – Índice de seletividade das formulações testadas	93
Tabela 17 – Valores de R ² obtidos dos modelos de Higuchi e Ritger-Peppas	96

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AB	Ácido Betulínico
ABL	Ácido Betulínico com óleo de linhaça
ALA	Ácido alfa-linolênico
AOCS	<i>American Oil Chemists' Society</i>
BCRJ	Banco de células do Rio de Janeiro
BFF	Controle da formulação FF
BFP	Controle da formulação FP
BHL	Balanco Hidrofílico Lipofílico
CG-DIC	Cromatografia Gasosa com Detector de Ionização em Chama
CG-EM	Cromatografia Gasosa acoplada ao Espectrômetro de Massas
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DP	Desvio Padrão
EE	Eficiência de Encapsulação
ELD	Espalhamento de Luz Dinâmico
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
FF	Formulação contendo somente Pluronic F127 como tensoativo
FP	Formulação contendo somente Pluronic F127 e PGPR como tensoativos
FTIR	Espectroscopia no Infravermelho com Transformada de Fourier
IC ₅₀	Coincentração inibitória média
LD	Limite de Detecção
LQ	Limite de Quantificação
MWCO	<i>Molecular Weight Cut-Off</i>
NBR	Norma Brasileira

NCI	National Cancer Institute
NIST	<i>National Institute of Standards and Technology</i>
PDI	Índice de Polidispersão
PEG	Polietileno Glicol
PGPR	Polirricinoleato de Poliglicerol
PZ	Potencial Zeta
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
MET	Microscopia Eletrônica de Transmissão

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	18
2	FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA.....	20
2.1	Quimioterápicos.....	20
2.2	Carcinoma colorretal	21
2.3.1	<i>Preparo de nanoemulsões</i>	23
2.3.2	<i>Fatores que afetam a estabilidade</i>	24
2.3.3	<i>Mecanismos de desestabilização.....</i>	25
2.4	Considerações sobre os componentes das formulações	26
2.4.1	<i>Ácido betulínico.....</i>	26
2.4.2	<i>Óleo de linhaça</i>	28
2.4.3	<i>Pluronic F127.....</i>	29
2.4.4	<i>Polirricnoleato de poliglicerol (PGPR).....</i>	30
2.5	Supositórios.....	31
2.5.1	<i>Ensaio de dissolução de supositórios.....</i>	33
2.6	Estado da arte	34
3	OBJETIVOS	36
3.1	Objetivo geral	36
3.2	Objetivos específicos.....	36
4	MATERIAIS E MÉTODOS.....	37
4.1	Matérias-primas e reagentes	37
4.2	Linhagens celulares	37
4.3	Equipamentos	37
4.4	Extração e caracterização do óleo de linhaça	39
4.4.1	<i>Extração do óleo de linhaça.....</i>	39

4.4.2	<i>Perfil de ácidos graxos do óleo de linhaça</i>	39
4.4.3	<i>Espectroscopia de absorção no Infravermelho com Transformada de Fourier (FT-IR)</i>	41
4.4.4	<i>Determinação da viscosidade dinâmica e densidade</i>	41
4.5	Caracterização do ácido betulínico	42
4.5.1	<i>Ressonância Magnética Nuclear de ¹H e ¹³C</i>	42
4.5.2	<i>Espectroscopia de absorção no Infravermelho com Transformada de Fourier (FT-IR)</i>	42
4.6	Determinação do BHL requerido pelo Óleo de Linhaça	42
4.6.1	<i>Estresse mecânico</i>	44
4.6.2	<i>Tamanho de partícula, índice de polidispersão e potencial zeta</i>	44
4.7	Preparo e caracterização das nanoemulsões contendo ácido betulínico	45
4.7.1	<i>Tamanho de partícula, índice de polidispersão e potencial zeta</i>	46
4.8	Quantificação do ativo	47
4.8.1	<i>Preparo dos padrões</i>	47
4.8.2	<i>Preparo da amostra</i>	47
4.8.4	<i>Validação do método analítico</i>	48
4.8.4.1	<i>Seletividade</i>	48
4.8.4.2	<i>Linearidade</i>	48
4.8.4.3	<i>Limite de detecção e limite de quantificação</i>	49
4.8.4.4	<i>Recuperação</i>	49
4.8.4.5	<i>Repetibilidade</i>	49
4.9	Eficiência de Encapsulação	50
4.10	Estudo de estabilidade coloidal	50
4.11	Reologia	51
4.12	Avaliação do potencial citotóxico in vitro	51

4.12.1	<i>Cultura de células</i>	51
4.12.2	<i>Teste MTT</i>	52
4.13	Preparo dos supositórios	53
4.14	Ensaio de dissolução dos supositórios	54
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	55
5.1	Extração e caracterização do óleo de linhaça	55
5.1.1	<i>Perfil de ácidos graxos do óleo de linhaça</i>	56
5.1.2	<i>Espectroscopia de absorção no infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR)</i>	57
5.1.3	<i>Análises físico-químicas do óleo de linhaça</i>	58
5.2	Caracterização do ácido betulínico	60
5.2.1	<i>Ressonância Magnética Nuclear de ¹H e ¹³C</i>	60
5.2.2	<i>Espectroscopia de absorção no infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR)</i>	66
5.3	Desenvolvimento da formulação das nanoemulsões	67
5.4	Caracterização das nanoemulsões FF e FP	71
5.4.1	<i>Potencial Hidrogeniônico (pH)</i>	71
5.4.2	<i>Tamanho de Partícula e índice de Polidispersão</i>	72
5.4.3	<i>Potencial Zeta</i>	73
5.5	Quantificação do Ativo	73
5.5.1	<i>Validação do método de quantificação do ácido betulínico</i>	73
5.5.1.2	<i>Seletividade</i>	73
5.5.1.3	<i>Linearidade</i>	74
5.5.1.4	<i>Limite de quantificação e limite de detecção</i>	75
5.5.1.5	<i>Recuperação</i>	75
5.5.1.6	<i>Repetibilidade</i>	76

5.5.2	<i>Aplicação do método validado na quantificação do ativo nas formulações.....</i>	76
5.6	Eficiência de Encapsulação	76
5.7	Morfologia.....	77
5.8	Estudo de estabilidade.....	77
5.9	Reologia	81
5.10	Avaliação do potencial citotóxico.....	83
5.11	Ensaio de dissolução.....	93
6	CONCLUSÃO	97
	REFERÊNCIAS	98

1 INTRODUÇÃO

Dados do Instituto Nacional de Câncer e do Ministério da Saúde estimam a ocorrência de cerca de 600 mil casos novos de câncer no Brasil em 2018, segundo o levantamento, as estimativas para 2019 são as mesmas (INCA, 2018). Tendo em vista a alta incidência dessa enfermidade em todo o mundo, diversos esforços vêm sendo realizados no intuito de se desenvolver ou aperfeiçoar terapias antineoplásicas. Basicamente, as formas mais utilizadas de combate ao câncer são: a cirurgia, a radioterapia, a hormonioterapia, imunoterapia e a quimioterapia (ONCOGUIA, 2013).

De forma geral, a quimioterapia é realizada por via venosa, embora alguns quimioterápicos possam ser administrados por via oral. Outra via é a administração retal, podendo ser eficaz para tratamento sistêmico ou local. A via retal tem vantagens sobre outras vias, como acessibilidade quando os pacientes estão inconscientes, vomitando ou incapazes de engolir, ou quando rejeitam a via parenteral. Outras vantagens estão relacionadas à proteção instável de medicamentos, minimização do metabolismo de drogas, prevenção da mucosa gástrica, melhora da eficácia para tratamentos intestinais localizados. (PUROHIT et al., 2018).

Quimioterápicos são medicamentos anticancerígenos utilizados para destruir as células tumorais de forma sistêmica. A grande desvantagem é o fato em atingir não somente as células cancerígenas como também as células sadias do organismo (ONCOGUIA, 2018). Posto isto, perspectiva-se o desenvolvimento de fármacos capazes de matar as células tumorais sem que sejam afetadas as células não cancerígenas, ou seja, fármacos de ação seletiva.

Uma substância anticancerígena de ação seletiva relatada por Pisha et al. (1995), é o ácido betulínico (ácido 3-beta-hidróxi-lup-20(29)-en-28-óico), considerado altamente promissor enquanto agente antineoplásico após a indução do apoptose em linhas celulares de melanoma *in vitro* e *in vivo*. Este composto é um triterpeno pentacíclico amplamente distribuído e conhecido do reino vegetal, que pode ser encontrado em muitas plantas, frutos e vegetais, embora em pequenas quantidades. Contudo, em maiores quantidades podemos extraí-lo da camada mais externa da casca de *Betula alba* L. ou da casca de eucalipto. Posteriormente, a atividade anticancerígena do composto e derivados foi confirmada como efetiva em outras linhas celulares com diferentes origens tais como mama, cólon, pulmão,

pâncreas, ovário, neuroblastoma ou osteossarcoma (LASZCZYK, 2009; ZHANG et al., 2015).

O mecanismo de ação antitumoral do ácido betulínico relaciona-se com a capacidade do mesmo induzir a morte celular por apoptose mitocondrial. Adquire, contudo, ainda mais relevância o interesse terapêutico desta substância quando se percebe que existe uma dada resistência das células não cancerígenas à sua ação (FULDA, 2008) sugerindo que este composto apresenta menor toxicidade. Contudo, mesmo diante destas propriedades, o ácido betulínico ainda não está sendo utilizado como medicamento.

No entanto, o ácido betulínico apresenta algumas limitações, no que se refere à sua baixa solubilidade (0,02 µg/mL), o que restringe a sua aplicação (JAGER, 2007). Porém, como forma de contornar esta problemática, novas formas de administração, como lipossomas ou nanoemulsões têm sido apresentadas (CSUK, 2014).

O presente trabalho relata a preparação, estabilidade, reologia e caracterização de nanoemulsões à base de ácido betulínico e óleo de linhaça estabilizadas com Pluronic F127 e polirricolinoleato de poliglicerol (PGPR). Este trabalho também relata o efeito antiproliferativo *in vitro* das nanoemulsões em células cancerígenas e sua aplicação na formulação de supositórios retais para permitir seu uso como formulação farmacêutica.

2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1 Quimioterápicos

Câncer é o nome dado ao conjunto de mais de 100 doenças que têm em comum o crescimento desordenado de células, que invadem tecidos e órgãos (INCA, 2019). Dividindo-se rapidamente, estas células tendem a ser muito agressivas e incontroláveis, determinando a formação de tumores, que podem espalhar-se para outras regiões do corpo. É uma das doenças que mais ocasiona morte no mundo e estima-se que 13 milhões de pessoas morram de câncer até 2030 (KUIPERS et al., 2015).

Basicamente, as formas mais utilizadas de combate ao câncer são: a cirurgia, a radioterapia, a hormonioterapia, imunoterapia e a quimioterapia (ONCOGUIA, 2019).

A quimioterapia tem eficácia comprovada e novas substâncias e associações são constantemente desenvolvidas. Porém, estas drogas ainda representam um dos mais tóxicos grupos farmacológicos conhecidos e estão relacionadas a lesões estruturais e modificações da fisiologia e bioquímica do corpo humano, algumas irreversíveis, que até podem se tornar o fator limitante do próprio tratamento (SIOCA; KIRITSIS, 2009).

Entre os efeitos colaterais comuns à maioria dos medicamentos quimioterápicos pode-se citar: perda de cabelo, inflamações na boca, perda de apetite, náuseas e vômitos, diarreia, infecções, hematomas ou hemorragias, fadiga, alergias e neuropatias (ONCOGUIA, 2019).

Os quimioterápicos mais conhecidos são: altretamina, bussulfan, carboplatina, carmustina, clorambucil, cisplatina, ciclofosfamida, dacarbazina, lomustina, citarabina, melfalano, oxaliplatina, temozolomida, tiotepa, metotrexato, pemetrexede, 6-mercaptopurina, 6-tioguanina, capecitabina, azatioprina, 5-fluoruracil, doxorubicina, daunoblastina, epirubicina, idarrubicina, gencitabina, bleomicina, mitomicina, mitoxantrona, vincristina, vimblastina, paclitaxel, hidroxiureia, asparaginase, irinotecano, etoposídeo, teniposídeo, trifluridina, tipiracila, mitoxantrona, azactidina, fludarabina e decitabina. (INCA, 2019; ONCOGUIA, 2019)

Vários agentes quimioterápicos, notadamente o 5-fluoruracil (e sua análogo capecitabina), cisplastina, vinblastina, bleomicina e ciclofosfamida, estão associados à cardiotoxicidade, incluindo espasmo coronariano, toxicidade vascular aguda, cardiomiopatia

reversível, tromboembolismo, angina e infarto do miocárdio (YE et al., 2009; KARAKULAK et al., 2016).

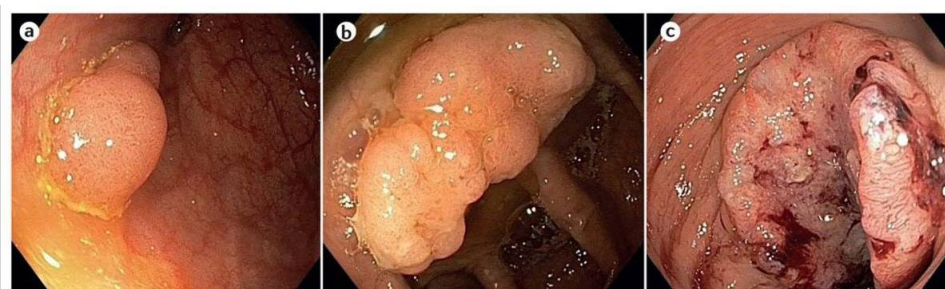
2.2 Carcinoma colorretal

O câncer do intestino grosso, também chamado câncer de cólon e reto, ou câncer colorretal, é uma doença que atinge indistintamente homens e mulheres. O Instituto Nacional de Câncer (INCA) estima que para cada ano do biênio 2018/2019, sejam diagnosticados 36.360 novos casos de câncer colorretal (17.380 em homens e 18.980 em mulheres) no Brasil. É o terceiro tipo mais frequente em homens e o segundo entre as mulheres.

Na maioria dos casos, o câncer colorretal se forma a partir de um pólip, que pode se desenvolver na parede do cólon ou do reto ao longo do tempo (KUIPERS et al., 2015). A Figura 1 mostra as imagens de câncer colorretal em diferentes estágios.

Figura 1– Câncer colorretal em diferentes estágios

Legenda:(a) Um pequeno tumor. (b) Um tumor avançado e maior. (c) Um carcinoma sigmoide grande e ulcerado.



Fonte: Kuipers et al. (2015).

A doença pode estar associada ao espectro de sintomas, incluindo sangue nas fezes, alteração nos hábitos intestinais e dor abdominal. Outros sintomas incluem fadiga, sintomas relacionados à anemia, como aparência pálida, falta de ar e perda de peso.

Novos tratamentos para câncer colorretal primário e metastático foram desenvolvidos e incluem cirurgia laparoscópica, radioterapia e quimioterapia (KUIPERS et al., 2015).

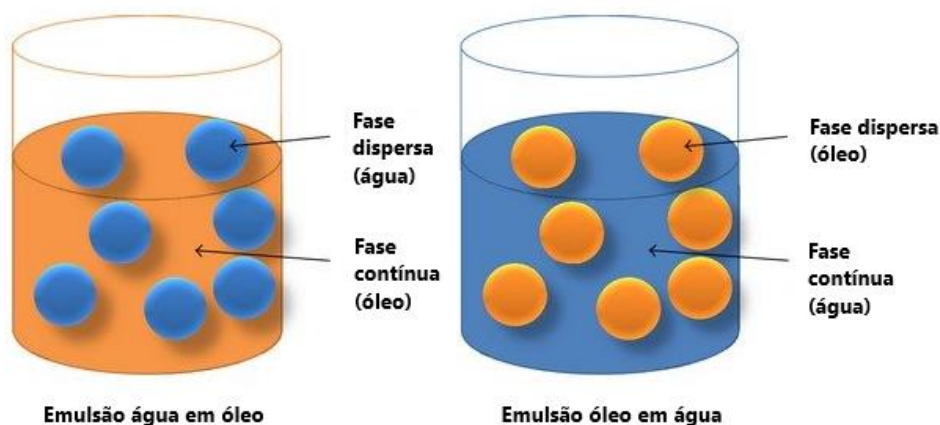
Os principais fármacos utilizados no tratamento do câncer colorretal são: 5-fluorouracil (5-FU), capecitabina, irinotecano, oxaliplatina, trifluridina com tipiracil (um medicamento combinado em forma oral). (LEE; CHU, 2017)

2.3 Nanoemulsões

Nanoemulsões são dispersões coloidais termodinamicamente instáveis, consistindo de dois líquidos imiscíveis, com um dos líquidos dispersos na forma de pequenas gotículas no outro líquido, onde a estabilidade é alcançada pela combinação de tensoativos. Seu tamanho de gotícula é de aproximadamente 20 e 500 nm (SHARMA et al., 2010). Como um sistema de entrega de fármacos, elas aumentam a eficácia terapêutica da droga e minimizam o efeito adverso e as reações tóxicas (JAISWAL et al., 2015).

A fase presente em maior volume torna-se a fase contínua e em menor quantidade a fase dispersa (Figura 2). Se o tensoativo principal for solúvel em água, favorece a emulsificação óleo em água e, inversamente, se o tensoativo for solúvel em óleo, favorece a emulsificação água em óleo.

Figura 2 – Tipos de emulsões quanto a composição das fases



Fonte: Khan et al. (2014, com adaptações).

A porção polar de um emulsificante é geralmente melhor barreira à desestabilização coloidal portanto, é possível fazer emulsão óleo em água com volumes de fase interna relativamente altos. Por outro lado, emulsões água em óleo se invertem facilmente se o teor de água é elevado. Em nanoemulsões múltiplas, a fase aquosa interna é dispersa em um óleo que por sua vez é disperso em outra fase aquosa em um sistema único. (SINGH et al., 2017)

As nanoemulsões podem ser transformadas em várias formas farmacêuticas como líquidos, cremes, sprays, géis, aerossóis, espumas; e pode ser administrado por diferentes vias, como tópica, oral, intravenosa, intranasal, pulmonar e oftálmica (KELA;KAUR, 2013).

A escolha do tensoativo depende do balanço entre as duas porções (lipofílica e hidrofílica) da molécula, denominado BHL - Balanço Hidrofílico Lipofílico. Este representa um sistema de classificação dos tensoativos, tendo como base os parâmetros de solubilidade desses compostos em solventes polares e/ou apolares. Uma escala numérica adimensional de valores de BHL entre 1 e 20 é usada para descrever a natureza do agente tensoativo, sendo que os valores aumentam de acordo com a hidrofília da molécula. O BHL de um tensoativo é uma propriedade importante no processo de emulsificação, pois determina o tipo de emulsão que tende a produzir (DAVIES et al., 1994). Agentes emulsificantes de BHL baixo tendem a formar emulsões água/óleo, ao passo que aqueles com BHL alto formam emulsões óleo/água.

A estabilidade física das nanoemulsões a longo prazo é uma consequência do tamanho pequeno das gotículas, o que dificulta a ocorrência de fenômenos de desestabilização convencionais, como a cremeação, a sedimentação e a coalescência (SINGH et al., 2017).

A liberação de fármaco encapsulado em sistemas nanoemulsionados envolve sua partição do óleo pela camada de tensoativo e depois em fase aquosa. A porção de fármaco difunde pelo óleo, entra em contato com a água circundante e sofre nanoprecipitação aumentando a área superficial da droga. Outros fatores, como a capacidade de se submeter ao transporte paracelular (através das junções entre as células) ou transcelular (atravessando a célula) também contribui no aumento da biodisponibilidade de fármacos mediada por nanoemulsão (SINGH et al., 2017).

2.3.1 Preparo de nanoemulsões

Vários métodos foram sugeridos para a preparação de nanoemulsões. A formação do sistema nanoemulsionado exige uma quantidade de energia, essa energia pode ser fornecida por equipamentos mecânicos ou pelo potencial químico do componente.

Os métodos para o preparo de nanoemulsões podem ser divididos em métodos de alta e de baixa energia. Os métodos que empregam alta energia incluem a homogeneização à alta pressão, sonicação e microfluidização, os quais requerem equipamentos específicos. Os

métodos que empregam baixa energia, utilizando a energia química armazenada nos componentes são, por exemplo, a emulsificação espontânea e o método da temperatura de inversão de fases (SINGH et al., 2017).

Entre esses métodos, o que utiliza sonicação é o melhor método de preparo de nanoemulsões. É um método eficiente e rápido para formar nanoemulsões estáveis com partículas de tamanhos menores. Consiste em produzir ondas de intensas vibrações ultrassônicas que rompem as gotículas primárias da emulsão, com a formação de gotículas de tamanhos nanométricos (BRUXEL et al, 2012).

2.3.2 Fatores que afetam a estabilidade

De maneira geral, as forças atrativas de van der Waals e as interações repulsivas entre as gotas irão influenciar na estabilidade de uma emulsão. Esta estabilidade geralmente está relacionada a resistência à coalescência (fusão) das gotas dispersas. Isso é dependente da natureza física do filme interfacial, da existência de barreira elétrica (pelo potencial zeta) ou estérica, da viscosidade da fase contínua, da distribuição do tamanho de gota, da temperatura, do volume de fase dispersa e da diferença de densidade entre as fases. (ROSEN, 2004)

As gotas de uma emulsão colidem a todo momento, devido ao frequente movimento destas, desta forma o filme interfacial deve ser resistente a esses choques, para que este não se rompa e acarrete na coalescência das gotas. Com isso o filme deve ter natureza física elástica para conseguir acompanhar as deformações das gotas (SINGH et al., 2017).

A presença de gotas carregadas na emulsão dificulta a aproximação destas, evitando a coalescência e a floculação, devido a formação de uma barreira elétrica (TADROS, 2004).

Em relação a distribuição de tamanho de gota, tem-se que quanto mais uniforme for esta distribuição, mais estável será a emulsão. As gotas maiores possuem área interfacial menor, são, então mais estáveis e tendem a crescer mais que as menores.

A frequência de colisão também depende do volume da fase dispersa. Por exemplo, com o aumento da concentração de óleo mais gotas serão formadas, aumentando a probabilidade de choque entre as gotas, favorecendo assim a coalescência destas (TADROS, 2004).

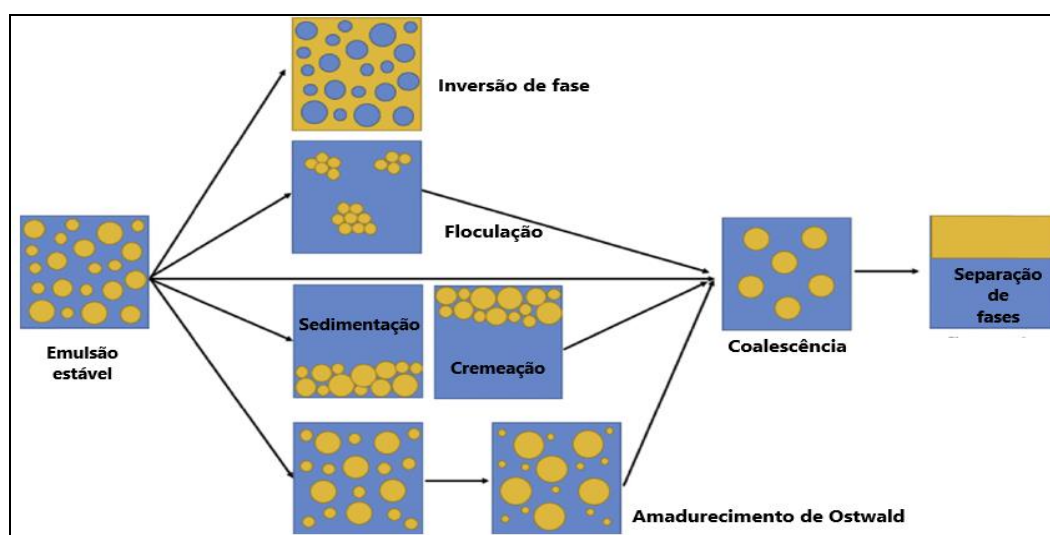
Outro fator importante é a diferença de densidade entre as fases, pois se essa diferença for muito significativa, pode ocorrer a separação de fases da emulsão. Para contornar este problema, faz-se uso de compostos que são conhecidos como agentes de peso que quando adicionados a uma das fases tem a função de deixar as densidades das duas fases mais próximas (SINGH et al., 2017).

2.3.3 Mecanismos de desestabilização

As emulsões podem desestabilizar devido a diversos mecanismos físico-químicos. Estabilidade da emulsão significa a capacidade de uma emulsão resistir a mudanças nas suas propriedades físico-químicas ao longo do tempo. Sendo importante identificar qual o mecanismo físico ou químico dominante responsável pela instabilidade de uma emulsão, pois esse conhecimento poderá ajudar a determinar uma estratégia para melhorar a sua estabilidade (McCLEMENTS, 2007; DICKINSON, 1992).

Dentre os mecanismos físicos podem ser citados os seguintes: os processos de separação devido à ação da gravidade, flotação/sedimentação, floculação, coalescência, amadurecimento de Ostwald e inversão de fase. (Figura 3)

Figura 3 – Mecanismos físicos de desestabilização de emulsões



Fonte: Hu et al. (2017, com adaptações).

No caso de emulsões óleo em água, a cremação ou sedimentação devido à ação da gravidade vai ocorrer quando a densidade do óleo for menor ou maior do que a densidade da

água. Na maioria dos casos, o óleo possuirá uma densidade menor do que a da água, podendo resultar na cremação (TADROS, 2004). Porém, esta pode ser prevenida com a adição de agentes de peso que aumentarão a densidade do óleo, igualando as duas densidades e evitando esses mecanismos de desestabilização por ação da gravidade.

O mecanismo de floculação é caracterizado pela aproximação das gotas, formando agregados, mantendo o filme interfacial e da individualidade das gotas. Na floculação, as gotas ficam próximas umas das outras por muito tempo, porém, as forças atrativas não são suficientemente significativas para que elas coalesçam formando uma única gota (AUFLEM, 2002). A floculação antecede a coalescência e a ruptura do sistema. A floculação pode ser em vários casos um processo reversível, que pode ser revertido com o fornecimento de muito menos energia do que a requerida no processo original de emulsificação (MYERS, 1999).

No mecanismo de coalescência ocorre a formação de uma única gota maior a partir de outras. Neste processo há a redução da área interfacial total e a ruptura do filme interfacial entre as gotas. Embora a coalescência resulte de mudanças microscópicas significativas na condição da fase dispersa, ela pode não resultar imediatamente em uma separação de fases.

A separação de fases, por outro lado, é macroscopicamente visível, e é uma consequência do processo microscópico de coalescência da gota. Nesse evento, a identidade individual da gota é perdida, assim como as propriedades físicas e químicas da emulsão (MYERS, 1999).

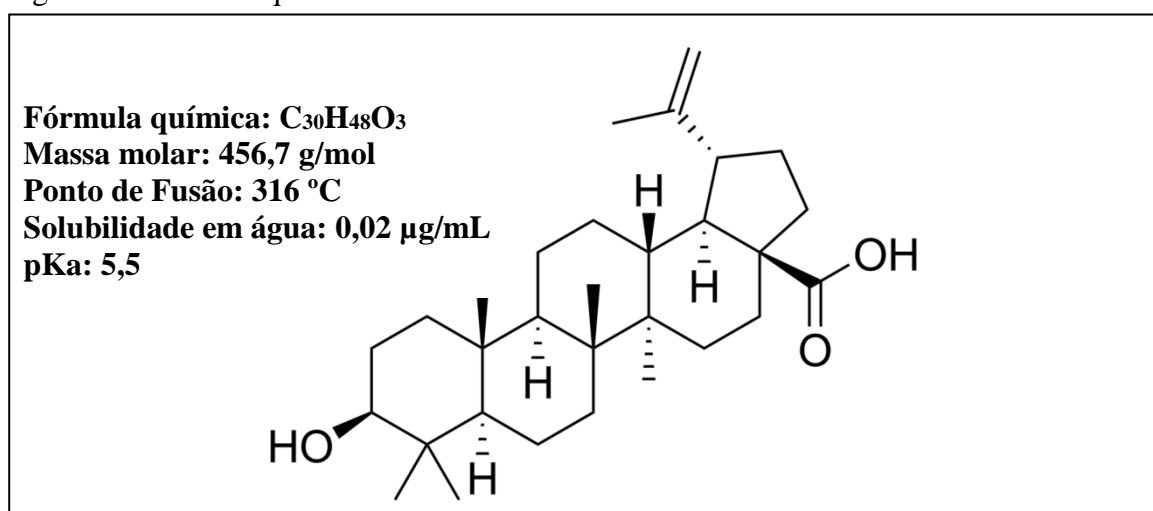
O envelhecimento de Ostwald resulta do fato de que as fases não são totalmente imiscíveis. As gotas menores possuem solubilidade maior quando comparadas com as gotas maiores. As gotas menores tendem a se incorporar a gotas maiores fazendo com que as gotas maiores cresçam em detrimento das menores (TADROS, 2004).

2.4 Considerações sobre os componentes das formulações

2.4.1 Ácido betulínico

O ácido betulínico (ácido 3-beta-hidróxi-lup-20(29)-en-28-óico) é um triterpeno pentacíclico, massa molar 456,7 g/mol, cuja estrutura química está representada na Figura 4, está amplamente distribuído no reino vegetal, onde pode ser encontrado em muitas plantas, frutos e vegetais, embora em pequenas quantidades.

Figura 4 - Estrutura química do ácido betulínico



Fonte: Elaborado pelo autor.

Pode ser obtido da *Quisqualis fructus*, *Coussarea paniculata*, *Caesalpinia paraguariensis*, *Vitex negundo*, *Ilex macropoda*, *Anêmona raddeana*, *Doliocarpus schottianus*, *Tovomita krukovii*, *Chaenomeles lagenaria*, *Berlinia grandiflora*, *Orthosiphon stamineus*, *Eucalipto camaldulensis*, *Physocarpus intermedium*, *Tetracentron sinense*, *Syncarpa glomulifera*, *Combretum quadrangulare*, *Tetracera boiviniana*, *Zizyphus joazeiro*, *Uapaca nidida*, *Ipomea pescaprae*, *Ancistrocladus heyneanus*, *Diospyros leucomelas*, *Syzgium claviformum* e em maior quantidade na *Betula alba* (YOGEE SWARI; SRIRAM, 2005).

Este composto é descrito na literatura como potencial substância anti-inflamatória, antibacteriana, analgésica e antineoplásica. Sua ação citotóxica contra várias linhagens tumorais foi comprovada sendo capaz de induzir a apoptose (autodestruição celular) mitocondrial através da permeabilidade com ativação das caspases (proteases constituídas por cisteína e ácido aspártico) e a fragmentação nuclear. A grande vantagem oferecida por esta substância é a seletividade que ela oferece, diminuindo riscos de efeitos colaterais sistêmicos. (KUMAR et al., 2018)

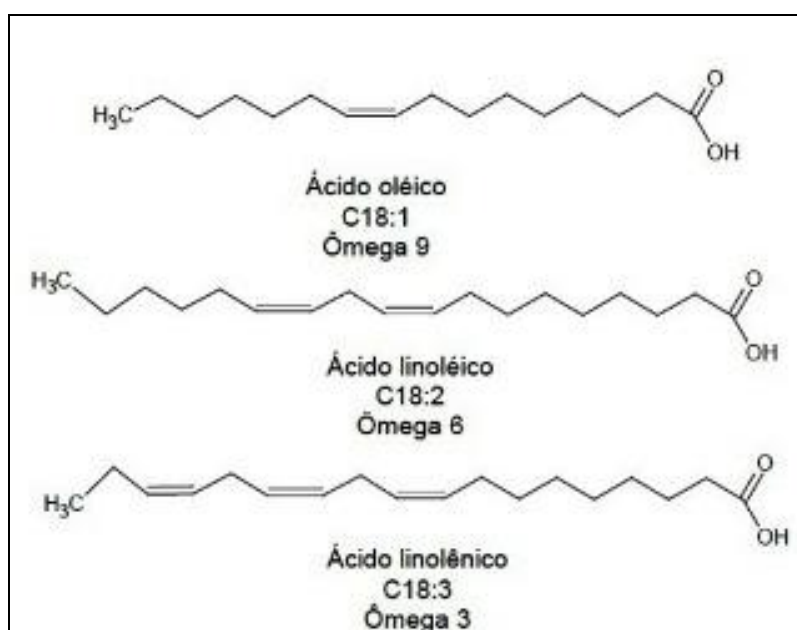
Foi identificado como um inibidor seletivo e indutor de apoptose em células de melanoma humano, neuroectoderma incluindo neuroblastoma, meduloblastoma, glioblastoma e as células de sarcoma de Ewing (FULDA et al., 1999). Esses achados sugerem que o ácido betulínico pode ser um novo protótipo promissor no tratamento de tumores neuroectodérmicos *in vivo*.

No entanto, sua aplicação clínica é limitada pela sua baixa solubilidade em água (DAI et al., 2014) com valor de 0,02 µg/mL (JAGER et al., 2007). Como alternativa para solucionar este problema, novas formas de administração, como lipossomas (MULLAUER et al., 2011), nanotubos carboxilados (TAN et al., 2014), ciclodextrina (SOICA et al., 2014) e nanoemulsões (DEHELEAN et al., 2011) foram apresentados com melhores resultados contra células tumorais em comparação com o ácido betulínico puro.

2.4.2 Óleo de linhaça

A semente de linhaça (*Linum usitatissimum* L.) popularmente conhecida como linhaça ou linho, é uma planta pertencente à família das Lináceas originária da Ásia (KAITHWAS; MAJUMDAR, 2013) é uma fonte vegetal rica em óleo polinsaturado contendo ácidos graxos ômega (Figura 5), sobretudo o ácido α -linolênico, que tem efeitos benéficos.

Figura 5 – Estruturas químicas dos ácidos graxos ômega 3, 6 e 9



Fonte: Elaborado pelo autor.

Existem duas variedades de linhaça para consumo humano, a linhaça marrom e a linhaça dourada. Sua cor é determinada pela quantidade de pigmentos no revestimento externo da semente, sendo que essa quantidade é determinada por fatores genéticos e ambientais (BARROSO et al., 2014). Existem evidências de que a linhaça marrom e a

dourada são semelhantes em sua composição química, portanto, é possível que ambas apresentem bioatividade similar (MUELLER et al., 2010; BARROSO et al., 2014).

Os ácidos graxos são os principais componentes das membranas celulares. A fluidez da membrana é altamente influenciada pela presença de ácidos graxos ômega-3 ou ômega-6, fato que pode afetar significativamente as funções celulares, uma vez que afeta a permeabilidade e secundariamente, o transporte de proteínas. Fukui et al. (2013) já haviam mostrado que os ácidos ômega 3 são capazes de causar acumulação de espécies reativas de oxigênio mitocondrial em células de câncer de mama humano. O acúmulo dessas espécies, por sua vez, ativa a apoptose através das caspases o que torna o óleo da semente de linhaça candidato a estudos envolvendo atividade anticancerígena (FUKUI et., 2013).

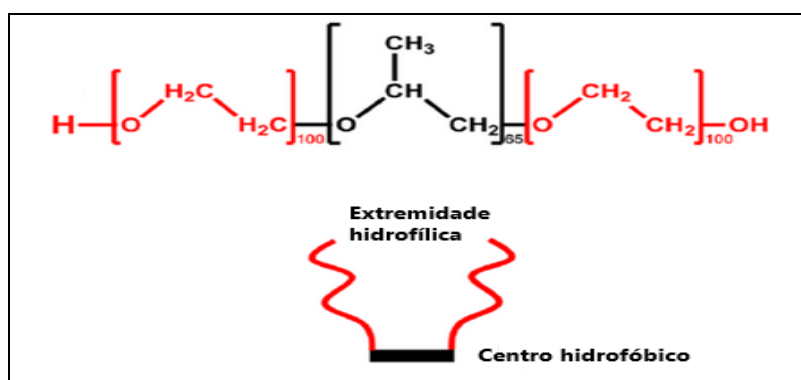
A linhaça é a fonte vegetal mais rica do ácido graxo ω -3, ou seja, o ácido α -linolênico (ALA) (GEBAUER et al. 2006). Os ácidos graxos são os principais componentes das membranas celulares e a fluidez da membrana é altamente influenciada pela presença de ácidos graxos ômega-3 ou ômega-6, fato que pode afetar significativamente as funções celulares, uma vez que afeta a permeabilidade e secundariamente, o transporte de proteínas.

2.4.3 Pluronic F127

Um grupo de copolímeros com destaque em formulações farmacêuticas são os Pluronic ou Poloxamers que são copolímeros não-tóxicos aprovados pela FDA (Food and Drug Administration), são formados por um bloco central de (poli)(óxido) de propileno (P_m) com caráter lipofílico e nas extremidades por blocos de (poli)(óxido) de etileno (E_n) de caráter mais hidrofílico devido a essa estrutura são utilizados como tensoativos (GIOFFREDI et al., 2016).

O Pluronic F127 (Figura 6), BHL 22, tem sido testado em fármacos, é um copolímero tribloco, possui fórmula $E_{100}P_{65}E_{100}$ (WANG et al., 2014), sólido de cor branca, com massa de 12.500 Daltons tendo como vantagem, além da sua não toxicidade, o fato de partículas formadas com este copolímero, não serem capturadas pelos macrófagos, aumentando seu tempo em contato com o sangue (LIN et al., 2018).

Figura 6 – Estrutura do Pluronic F127



Fonte: Wang et al. (2014, com adaptações).

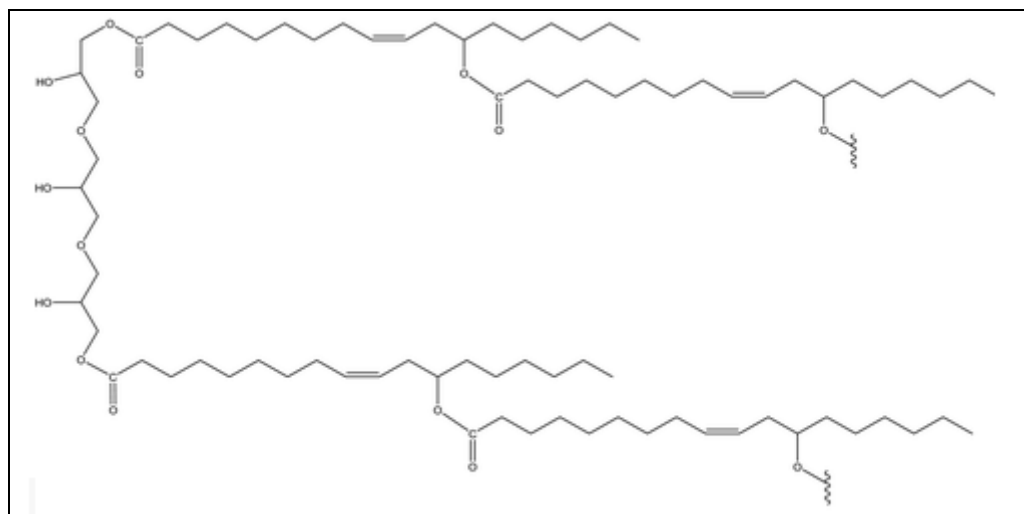
Outra característica marcante dos Poloxamers é o fato de possuírem a capacidade de atuar como inibidores da glicoproteína P, principal proteína da membrana responsável pelo fluxo de fármaco da célula, e do citocromo P450 3A (CYP3A), principal enzima metabólica da célula, conferindo maior disponibilidade local do fármaco e aumentando a atividade terapêutica da formulação (GUAN et al., 2011).

Em tumores multirresistentes a fármacos, os blocos dos poloxamers são capazes de atuar nas células tumorais, aumentando a sua permeabilidade aos fármacos antineoplásicos, podendo também induzir modificações em diversas funções celulares, dentre elas a expressão gênica, a respiração mitocondrial e a síntese de ATP, aumentando a eficácia do tratamento (DEVI et al., 2013).

2.4.4 Polirricinoleato de poliglicerol (PGPR)

Polirricinoleato de poliglicerol (Figura 7), fórmula química $C_{18}H_{34}O_3 \cdot x(C_3H_8O_3)_n$, é o produto formado pela esterificação de poligliceróis com ácidos graxos de óleo de rícino. É um líquido límpido e altamente viscoso, insolúvel em água e etanol, mas solúvel em éter, hidrocarbonetos e hidrocarbonetos halogenados. (MORTENSEN, et al., 2017)

Figura 7 – Estrutura química do PGPR



Fonte: Mortensen et al. (2017).

É um tensoativo muito utilizado na indústria de alimentos, possui BHL ~ 1 (BUTT, WOLLMER, AUERNHAMMER, 2008), também é utilizado no preparo de emulsões água em óleo, porém pode ser utilizado no ajuste de BHL em emulsões óleo em água com outro tensoativo de maior BHL.

Em testes de segurança realizados em ratos com o PGPR, não houve interferência no metabolismo normal da gordura ou na utilização de vitaminas lipossolúveis. Nenhuma evidência foi encontrada de quaisquer efeitos adversos em processos vitais como o crescimento, reprodução e manutenção da homeostase dos tecidos (BASTIDA-RODRIGUEZ, 2013) sendo considerado um tensoativo seguro.

2.5 Supositórios

Os supositórios são uma forma de dosagem projetada para administrar drogas através das vias de administração retal e vaginal. Podem ser compostos por manteiga de cacau, óleo de coco, gelatina, glicerina, óleos vegetais hidrogenados e gorduras duras, polietilenoglicóis (PEGs) e ésteres de ácidos graxos de PEG (ALI, 2017). Com uma combinação dessas bases de excipientes ou não, os supositórios classificam-se em dois tipos: base lipofílica ou hidrofílica.

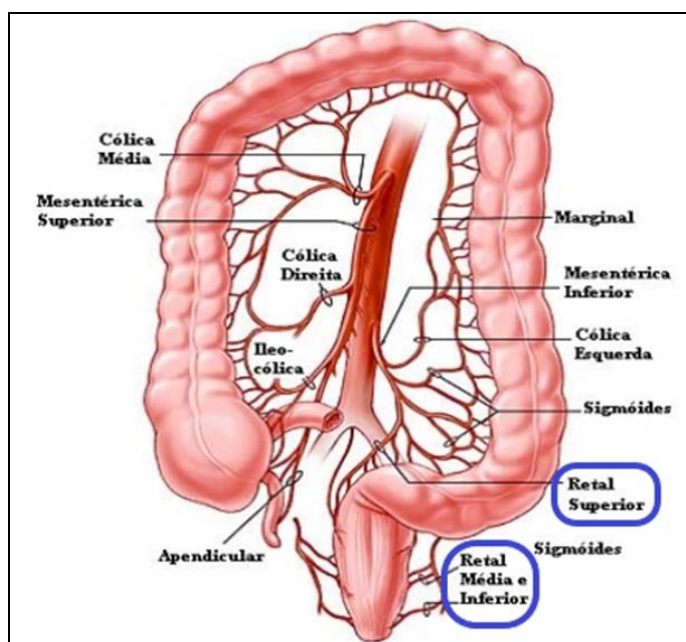
A administração retal através de um supositório pode minimizar a toxicidade da quimioterapia podendo ser eficaz para tratamento sistêmico ou local (HAM e JUNIOR,

2017). A via retal tem vantagens sobre outras vias, como acessibilidade quando os pacientes estão inconscientes, vomitando ou incapazes de engolir, ou quando rejeitam a via parenteral. Outras vantagens estão relacionadas à proteção de medicamentos instáveis, minimização do metabolismo de drogas, proteção da mucosa gástrica, eficácia superior para tratamentos intestinais localizados. (PUROHIT et al., 2018).

Há relatos que no pré-operatório em ratos com câncer retal, o uso de quimioterápicos administrados via supositórios apresentou significativamente menos toxicidade e maior concentrações do fármaco nos tecidos próximos ao tumor em comparação a administração oral (POKORNY et al., 1997).

Supositórios podem atuar de forma local e sistêmica pois as veias retais inferior e média fluem para a veia cava inferior (Figura 8), portanto esse sangue vai diretamente para o coração e para a circulação geral. A veia retal superior flui para a veia porta e, portanto, esse sangue passa pelo fígado antes de atingir o coração.

Figura 8 – Anatomia arterial do intestino



Fonte: www.anatomiadocorpo.com (2019, com adaptações)

Isto significa que os medicamentos administrados por via retal podem entrar na circulação geral diretamente se estiverem localizados na parte mais inferior do reto, ou passando através do fígado se estiverem localizados mais acima (BAVISKAR et al., 2013 e CHOONARA, 1987). Em resumo, drogas absorvidas na parte média e inferior do reto

passam diretamente para a circulação geral e evitam o metabolismo de primeira passagem no fígado. No entanto, a biodisponibilidade da parte superior do reto será baixa para certos fármacos, uma vez que será metabolizada pelo fígado durante a sua primeira passagem e apenas uma proporção das moléculas do fármaco entrará na circulação geral de forma intacta não metabolizada.

2.5.1 Ensaio de dissolução de supositórios

A liberação do fármaco de uma forma farmacêutica sólida pode envolver as etapas: desintegração, desagregação e dissolução. Essas etapas podem ocorrer concomitantemente, com a consequente liberação do fármaco da forma farmacêutica (SERRA; STORPIRTIS, 2007).

A dissolução pode ser definida como o processo pelo qual uma substância sólida se dispersa no solvente para formar uma solução. No entanto, não está relacionado somente a medida da taxa de solubilidade, podendo ser mais corretamente descrita como um ensaio físico para prever a liberação para uma determinada área numa determinada quantidade e no tempo correto. A velocidade pela qual o processo de dissolução ocorre determinará, portanto, liberação do fármaco e a sua absorção. Em função disso os estudos de dissolução *in vitro* tornaram-se fundamentais para assegurar a qualidade das formulações na forma sólida de uso oral, bem como para permitir a otimização das mesmas quando em desenvolvimento (ADAMS et al., 2001; ABUZARUR-ALOU et al., 1997; TINGSTAD, 1978).

A velocidade de liberação do fármaco, no caso de supositórios com utilização de matrizes gelatinosas constituídos à base de polímeros hidrofílicos, é condicionada por um ou mais dos seguintes mecanismos cinéticos (LOPES; LOBO; COSTA, 2005):

- Transporte do meio de dissolução para a matriz polimérica;
- Intumescimento (“*swelling*”) do polímero com formação de uma camada de gel;
- Difusão do fármaco através da camada de polímero intumescido;
- Erosão do polímero intumescido.

Existem muitos modelos matemáticos com o objetivo de descrever a liberação do fármaco a partir da forma farmacêutica matricial como no caso em supositórios de gelatina (OFOEFULE et al., 2000).

Os sistemas de liberação controlados por erosão são preparados pela incorporação do fármaco em polímeros hidrossolúveis. A liberação do fármaco a partir de formas farmacêuticas sólidas matriciais deste tipo envolve dois processos em sequência, dependentes do tempo, que são a difusão do meio para o interior da matriz com consequente entumescimento e formação de um gel e a degradação/erosão, que podem ocorrer de modo simultâneo até a completa desagregação das cadeias poliméricas. O diferente modo como a erosão ocorre condiciona o perfil de liberação do fármaco. (MANADAS; PINA; VEIGA, 2002)

Existem numerosos métodos experimentais de aparatos para ensaios de dissolução de supositórios que podem ser divididos em métodos sem membrana (métodos sem agitação, métodos com agitação, nos quais a forma farmacêutica pode ficar em contato com o meio de dissolução ou não) e métodos com membrana nos quais a forma farmacêutica é separada do meio de dissolução por uma membrana (FRIEDEL, 2018).

O uso de membranas no teste é a princípio atrativo, uma vez que se obtém uma solução filtrada pronta para quantificação. Entretanto, ela introduz um processo de transporte artificial e não é, geralmente, recomendada para supositórios (SIEWERT, 2003). Para supositórios hidrofílicos que liberam o fármaco após dissolução nos líquidos retais, pode-se utilizar os aparatos da cesta, pá ou célula de fluxo. (SIEWERT, 2003).

2.6 Estado da arte

O ácido betulínico foi relatado a primeira vez como anticancerígeno em 1995 por Pisha et al. descrevendo-o como um seletivo inibidor do melanoma humano. Desde esta descoberta, vários estudos adicionais demonstraram a ação citotóxica efeitos deste grupo triterpenoide contra várias linhas celulares de câncer, destacando o potencial promissor este grupo como drogas antineoplásicas potenciais. Somente após nove anos, foi comprovada a sua atividade citotóxica frente a células de HL-60 (POON et al., 2004).

O primeiro artigo sobre o encapsulamento do ácido betulínico só foi publicado em 2011, no caso em lipossomas (MULLAUER et al., 2011) no qual relatam que utilizaram a fosfatidilcolina:fosfatidilglicerol do ovo como estabilizantes os quais foram aplicadas no tratamento intravenoso em ratos nus xenoenxertados com tumores humanos do câncer de cólon e do pulmão mostrando-se eficaz na redução do tamanho do tumor em mais de 50% .

Ainda no mesmo ano, Dehelean et al. desenvolveram nanoemulsões com ácido betulínico usando o método de homogeneização a alta pressão produzindo gotículas de tamanho foi <200 nm com eficiência de encapsulamento > 90% e comprovando também a atividade anti-angiogênica em tumores. E em 2017, Harwansh et al. relataram um estudo do desenvolvimento de nanoemulsões carregadas com ácido betulínico com comprovação de atividade hepatoprotetora, sendo esta nanoemulsão composta por óleo de oliva, fase aquosa e como tensoativos o labrasol e plurol isoestearato de poliglicerila.

Outras estratégias nanotecnológicas para o carregamento do ácido betulínico foram publicadas como o uso de nanotubos de carbono (TAN et al., 2014) comprovando também os efeitos anticancerígenos do ácido betulínico *in vitro*; com o uso de nanopartículas magnéticas formando nanocompósitos com quitosana em células MCF-7 (câncer de mama) carregadas com ácido betulínico (HUSSEIN et al., 2014); e com o uso de um complexo de inclusão entre ácido betulínico e β -ciclodextrina melhorando a dissolução deste fármaco e sua atuação inibitória frente a células de melanoma de murinos (B164A5) em comparação com apenas o ácido betulínico livre (SOICA et al., 2014).

Quanto a sua atuação frente a células de HCT-116, recentemente foi publicado um trabalho relatando a indução de apoptose e inibição de metástase pelo ácido betulínico puro em células de carcinoma coloretal humano *in vitro* e *in vivo* (ZENG; HUA; ZHAO, 2019).

Em uma busca por palavras-chave na base do Scopus em 25 de março de 2019, para o termo “nanoemulsion” foram encontrados 3777 artigos de pesquisa, “betulinic acid” foram encontradas 1976 publicações, para os termos “*betulinic acid + nanoemulsion*” foram encontradas 4 publicações, e utilizando os termos “*betulinic acid + nanoemulsion + Pluronic F127*” e “*betulinic acid + suppositories*” nenhuma publicação.

Diante dos dados expostos, apesar do grande potencial de tratamento, a baixa solubilidade em água do ácido betulínico dificulta o uso em formulações farmacêuticas, um problema evidenciado pelo número limitado de estudos clínicos. No entanto, as novas estratégias nanotecnológicas podem melhorar muito a solubilidade, estabilidade e biodisponibilidade, favorecendo assim suas atividades anticancerígenas.

Com base no conjunto de pesquisas científicas apresentadas, pode-se afirmar que a temática abordada nesta pesquisa é de extremo interesse para a comunidade científica, reafirmando assim a relevância do produto farmacêutico proposto neste estudo.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Encapsular o ácido betulínico em nanoemulsões à base de óleo de linhaça estabilizadas com Pluronic F127 e PGPR e aplicá-las em um supositório retal como proposta de uma formulação anticâncer.

3.2 Objetivos específicos

- Extrair e caracterizar o óleo de linhaça;
- Caracterizar o ácido betulínico;
- Realizar um estudo para determinar o BHL (Balanço Hidrofílico Lipofílico) requerido pelo óleo de linhaça.
- Preparar as nanoemulsões contendo óleo de linhaça como fase oleosa, Pluronic F127 e PGPR como estabilizantes e ácido betulínico como princípio ativo;
- Determinar a Eficiência de Encapsulação do ácido betulínico nas nanoemulsões;
- Realizar um estudo da estabilidade coloidal das nanoemulsões;
- Avaliar a morfologia das nanoemulsões através de MET;
- Realizar um estudo reológico das nanoemulsões;
- Avaliar o potencial antiproliferativo *in vitro* das nanoemulsões frente a linhagens de células tumorais e não tumorais;
- Aplicar as nanoemulsões desenvolvidas na formulação de supositórios retais e avaliar o perfil de dissolução destes supositórios.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Matérias-primas e reagentes

Sementes de linhaça dourada (*Linum usitatissimum* L.) marca Jasmine, adquiridas no comércio de Fortaleza (CE); Pluronic F127, BHL 22 (BASF, Alemanha); Grinsted PGPR E-476, HLB 1-2 (Dupont Danisco, Dinamarca); Ácido Betulínico 98,13% (Quanao Biotech, China); Hidróxido de Sódio P.A., Clorofórmio P.A., Ácido Sulfúrico 98% P.A., Ácido Fosfórico P.A., Brometo de Potássio, grau espectrofotométrico (Synth, Brasil); Água ultra-pura estéril (Isopharma, Brasil); Metanol P.A., Cloreto de Amônio P.A., Hexano, grau CLAE, Acetonitrila, grau CLAE, Dimetilsulfóxido, grau ACS (Vetec, Brasil); Éter de Petróleo P.A. (Dinâmica, Brasil); Meio RPMI 1640 e DMEM, Soro fetal bovino 10% (Gibco®, EUA); Penicilina e Streptomina a 1%, Piridina-d5 Magnisolv 99,8%, MTT brometo de [3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difenil tetrazolium (Sigma-Aldrich, Alemanha).

4.2 Linhagens celulares

Tabela 1 – Linhagens celulares utilizadas na avaliação da citotoxicidade

Linhagem celular	Tipo	Origem
HCT-116	Carcinoma coloretal	NCI, EUA
H-460	Carcinoma pulmonar	NCI, EUA
SNB-19	Glioblastoma	NCI, EUA
HL-60	Leucemia	BCRJ, BRASIL
L-929	Fibroblastos de murinos normais	BCRJ, BRASIL

Fonte: Elaborada pelo autor.

4.3 Equipamentos

Equipamentos gerais

Prensa hidráulica, capacidade 15 ton/cm², modelo TE-098, marca Tecnal utilizada na extração do óleo de linhaça; Centrífuga, modelo 80-2B, marca Centribio utilizada no teste de estresse mecânico; Rotaevaporador, modelo RV 10, marca IKA utilizado no preparo das nanoemulsões; Viscosímetro digital, modelo DA300, marca Anton Paar; Densímetro digital, ,

modelo DMA 4500, marca Anton Paar; pHmetro, modelo Q400AS, marca Quimis; Estufa de secagem, modelo SL-101, marca Solab, utilizada no estudo de estabilidade;

Equipamentos para análise cromatográfica

Cromatógrafo gasoso GC-MS Agilent 5977A equipado com uma coluna capilar de sílica fundida HP-5MS (Agilent) (30 m × 0,25 mm, espessura de 0,25 µm) utilizado para obter o perfil de ácidos graxos;

Cromatógrafo a gás Shimadzu CG-2010 Plus equipado com um detector de ionização de chama (FID) e uma coluna de metilpolissiloxano RTX-5 (30 m × 0,25 mm × 0,25 µm). Para obter a porcentagem relativa dos ácidos graxos;

Cromatógrafo Líquido de Alta Eficiência Shimadzu, modelo LC-20AD, coluna Phenomenex Luna C18 (5 mm, 250 mm x 4,6 mm), bomba de alta pressão, detector SPD-20A, UV-VIS, utilizado para quantificar o ácido betulínico;

Equipamentos para análise espectroscópica

Espectrômetro de Infravermelho com transformada de Fourier, modelo IRTracer-100, marca Shimadzu;

Espectrômetro de Ressonância Magnética Nuclear 500 MHz, modelo Avance DRX-500, marca Bruker, utilizado na obtenção dos espectros do ácido betulínico;

Equipamentos para análise e preparo da nanoemulsões

Zetasizer Nano, modelo ZS ZEN 90, marca Malvern, utilizado para obter o índice de polidispersão, potencial zeta e tamanho de partícula;

Reômetro, modelo Advanced Rheometer AR 2000, marca TA Instruments, utilizado no estudo reológico.

Sonifier Ultrassom com sonda, modelo W-450D, marca Branson Sonifier, utilizado no preparo das nanoemulsões; Banho ultrassônico, modelo Q335d, marca Químis;

Equipamento utilizado nos testes de atividade antiproliferativa:

Leitor múltiplo de placas Elisa, Spectra Count.

Equipamento utilizado no ensaio dissolutor:

Dissolutor, modelo DT6R, marca Erweka.

4.4 Extração e caracterização do óleo de linhaça

O óleo de linhaça foi extraído e caracterizado quanto ao perfil de ácidos graxos por CGEM, FT-IR, determinação da viscosidade e densidade, índice de acidez, índice de saponificação, índice de iodo e índice de peróxidos.

4.4.1 Extração do óleo de linhaça

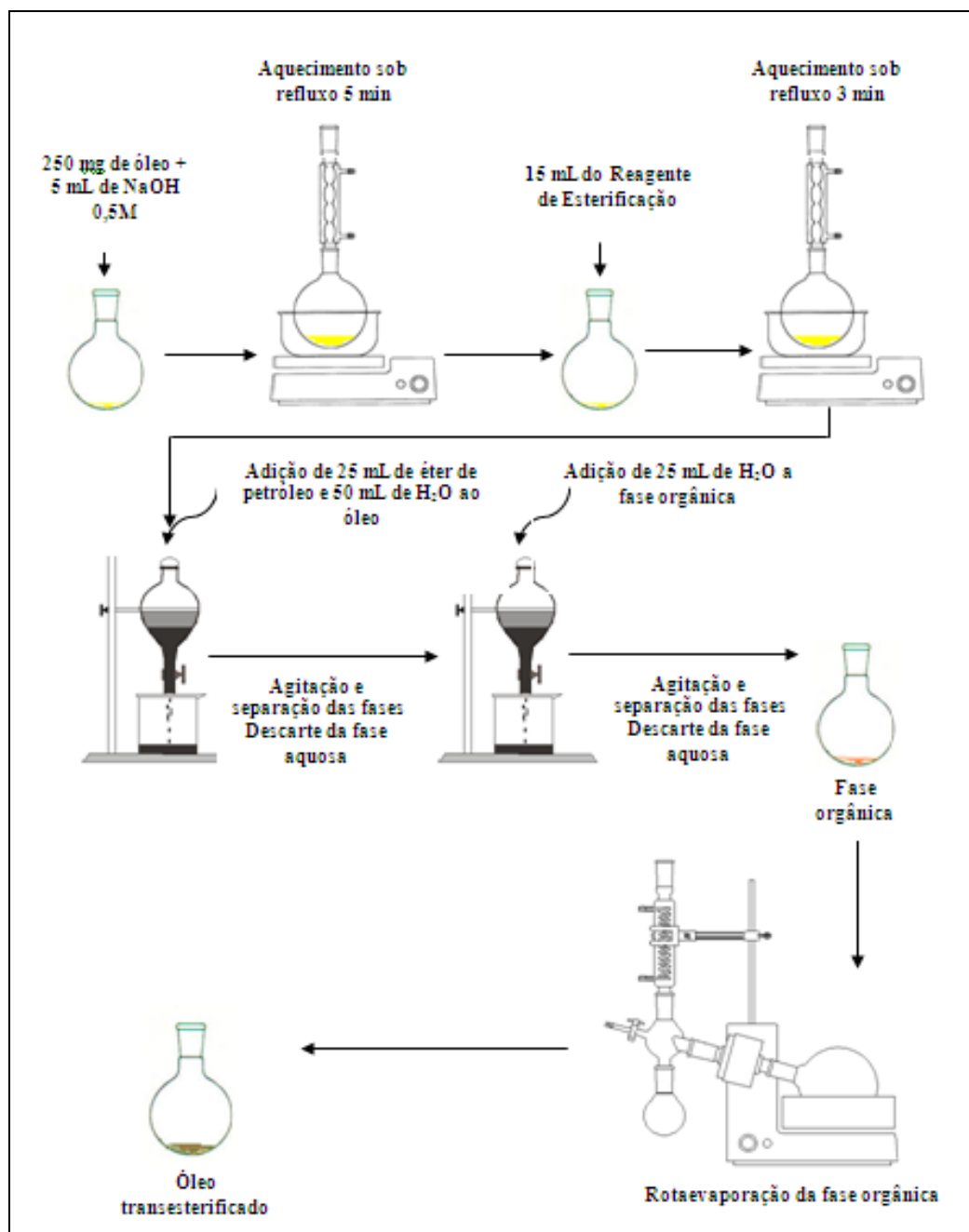
O óleo de linhaça foi extraído em prensa hidráulica aplicando-se uma pressão de 13 ton/cm². Cada 300 g de sementes foram colocadas em sacos de papel filtro e prensadas por 30 min. No total foram prensadas 3000 g de sementes de linhaça dourada. Após a extração, o óleo da semente de linhaça obtido foi centrifugado por 15 min a 4000 rpm para a separação das impurezas.

O óleo purificado foi acondicionado em frascos de vidro âmbar com tampa, completamente preenchidos para evitar oxidação, e armazenado sob refrigeração a uma temperatura de 10 °C ± 2 °C.

4.4.2 Perfil de ácidos graxos do óleo de linhaça

Inicialmente o óleo de linhaça foi transesterificado através do método proposto por Hartman e Lago (MILLINSK et al., 2008) para ser analisado por CG-EM (Cromatografia Gasosa acoplada ao Espectrômetro de Massas) e CG-DIC (Cromatografia Gasosa com Detector de Ionização em Chama) conforme Figura 9.

Figura 9 – Esquema representativo da transesterificação do óleo de linhaça



Fonte: Elaborado pelo autor.

O método consiste em adicionar a 250 mg do óleo, 5 mL de uma solução de hidróxido de sódio 0,5 M metanólica. Na sequência a mistura foi aquecida sob refluxo durante 5 min, posteriormente foi adicionado 15 mL do reagente de esterificação (preparado a partir de uma mistura de 2,0 g de cloreto de amônio, 60,0 mL de metanol e 3,0 mL de ácido sulfúrico concentrado). A mistura foi aquecida novamente sob refluxo por mais 3 min

e depois foi transferida para um funil de separação juntamente com 25,0 mL de éter de petróleo e 50,0 mL de água deionizada. Após agitação e separação de fases, a fase aquosa foi descartada. Foram adicionados mais 25,0 mL de água desionizada à fase orgânica e após a separação de fases, a fase aquosa foi descartada novamente. A fase orgânica foi coletada e o solvente foi rotaevaporado. A conversão foi confirmada através de CCD (Cromatografia de Camada Delgada) utilizando como revelador I_2 . Uma alíquota de 1 mg do óleo transesterificado foi adicionada a um vial e 1 mL de hexano para ser injetado no CG-EM e CG-DIC.

As amostras foram analisadas em um CG-EM conectado a um detector quadrupolo operando no modo EI a 70 eV com uma faixa de massa de varredura de 50-600 m/z e taxa de amostragem de 2,7 scans.s⁻¹. Uma razão de *split* de 1:100 foi usada com injeção de 1 µL e o hélio foi usado como gás de arraste a 1 mL.min⁻¹. O injetor e as temperaturas da interface foram de 250 °C e 280 °C, respectivamente. A rampa de temperatura foi: inicial de 35 °C com consecutivo aumento para 180 °C a 15 °C min⁻¹, seguido se aumento para 250 °C a 5 °C min⁻¹. A temperatura final (250 °C) foi mantida durante 23 min. Os picos foram identificados com base nos padrões de fragmentação usando o Programa de Pesquisa Espectral de Massa do NIST (Washington, DC, versão 2.0 de 2008 - 287.324 compostos). Para obter a porcentagem relativa, as amostras foram injetadas em um cromatógrafo a gás equipado com um detector de ionização. Foi empregado o mesmo método utilizado no CG-EM.

4.4.3 Espectroscopia de absorção no Infravermelho com Transformada de Fourier (FT-IR)

O espectro de transmitância no infravermelho do óleo de linhaça foi obtido na faixa entre 400 e 4.000 cm⁻¹, por meio de um analisador de infravermelho com transformada de Fourier utilizando a técnica de Refletância Total Atenuada (ATR). Os espectros foram registrados usando o software Opus 6.5.

4.4.4 Determinação da viscosidade dinâmica e densidade

A determinação da viscosidade dinâmica do óleo extraído foi realizada utilizando o equipamento viscosímetro digital. As determinações foram realizadas em triplicata a 20°C. A metodologia de análise utilizada foi a NBR-10441.

Para a determinação de densidade do óleo extraído foi utilizado um densímetro digital. As determinações foram realizadas em triplicata a 20 °C. A metodologia de análise utilizada foi a norma ABNT NBR-14065.

4.4.5 Determinação dos Índices de Acidez, Índice de Saponificação, Índice de Iodo e Índice de Peróxidos

As determinações dos Índices de Acidez, Índice de Saponificação, Índice de Iodo e Índice de Peróxidos foram realizadas em triplicata seguindo às metodologias oficiais da *American Oil Chemist's Society* (AOCS).

4.5 Caracterização do ácido betulínico

4.5.1 Ressonância Magnética Nuclear de ^1H e ^{13}C

Os espectros de ^1H e ^{13}C do ácido betulínico foram obtidos em espectrômetro operando na frequência ^1H a 300 MHz e do ^{13}C a 75,47 MHz. Para dissolução da amostra utilizou-se como solvente a piridina- d_5 . Preparou-se uma solução de ácido betulínico na concentração de 20 mg/0,6 mL de solvente. O espectro de ^1H foi referenciado pelo sinal em δ 8,69 da fração não deuturada da piridina- d_5 e de ^{13}C pelo pico central do tripleto do sinal em δ 149,98 da piridina- d_5 .

4.5.2 Espectroscopia de absorção no Infravermelho com Transformada de Fourier (FT-IR)

O espectro de transmitância no infravermelho do ácido betulínico foi gerado na faixa entre 400 e 4.000 cm^{-1} , por meio de um analisador de infravermelho com transformada de Fourier, utilizando a técnica com o uso de pellets de KBr contendo 0,1% (m/m) da amostra. Os espectros foram registrados usando o software Opus 6,5.

4.6 Determinação do BHL requerido pelo Óleo de Linhaça

Inicialmente foi realizado um estudo para determinar a proporção ideal entre os tensoativos Pluronic F127 (BHL 22) e PGPR (BHL 1-2) para formar emulsão estável com o óleo de linhaça em função dos resultados dos tamanhos de partícula, potencial zeta e índice

de polidispersão.

Determinou-se a quantidade de cada tensoativo utilizado para se obter BHL entre 1 e 22 através das Equações 1 e 2:

$$A + B = 100 \quad (\text{Equação 1})$$

$$(\text{BHL}_A \times 0,01A) + (\text{BHL}_B \times 0,01B) = \text{BHL desejado} \quad (\text{Equação 2})$$

A = % de Pluronic F127, B = % de Grinsted PGPR, BHL_A = BHL do Pluronic F127 e BHL_B = BHL do PGPR

Os valores A e B em percentual referem-se a proporções referentes ao total de 0,1 g de tensoativos. Na Tabela 2 estão descritas as quantidades de Pluronic F127 e Grinsted PGPR para obter BHL de 1 a 22.

Tabela 2 – Quantidade de tensoativos e BHL resultante

Pluronic F127 (g)	Grinsted PGPR (g)	BHL resultante
0	0,100	1
0,005	0,095	2
0,010	0,090	3
0,014	0,086	4
0,019	0,081	5
0,024	0,076	6
0,029	0,071	7
0,033	0,067	8
0,038	0,062	9
0,043	0,057	10
0,048	0,052	11
0,052	0,048	12
0,057	0,043	13
0,062	0,038	14
0,067	0,033	15
0,071	0,029	16
0,076	0,024	17
0,081	0,019	18
0,086	0,014	19
0,090	0,010	20
0,095	0,005	21
0,100	0	22

Fonte: Elaborado pelo autor.

Para efetuar os cálculos, considerou-se o BHL do Grinsted PGPR como 1. A formulação teste para determinar o BHL requerido foi 10% de óleo de linhaça, 1% de tensoativos e 89% de água. Foram preparados 10 g de cada formulação, composta cada por 1 g de óleo, 0,1 g de tensoativos e 8,9 g de água ultra-pura,

Para obter cada valor de BHL a partir do Pluronic F127 e do Grinsted PGPR, foram identificados 22 tubos para o preparo das emulsões, correspondendo cada tubo a um valor de BHL.

Em cada tubo foi adicionado 8,9 g de água e a quantidade de Pluronic F127 e foram colocados sobre refrigeração a 5 °C até que o Pluronic F127 fosse solubilizado. Posteriormente foi adicionado 1 g de óleo de linhaça em cada tubo e a quantidade de PGPR para obter cada BHL. O experimento para cada formulação foi realizado em triplicata.

O conteúdo de cada tubo foi submetido a sonicação em sonificador de sonda com amplitude de 70%, sob potência de 100-105W, por 1 min (10 s on/ 10 s off).

Após o preparo das emulsões, realizou-se o teste de resistência ao estresse mecânico (centrifugação) e foi determinado em triplicata o tamanho de partícula, potencial zeta e o índice de polidispersão de cada formulação com o objetivo de determinar a proporção ideal entre os tensoativos, ou seja, o BHL requerido pelo óleo.

4.6.1 Estresse mecânico

Alíquotas de 5 mL de cada amostra foram colocadas em frascos e submetidas às condições de estresse mecânico, através da centrifugação à rotação de 3000 rpm, por 30 min (SUGUMAR et al., 2014). Estas foram avaliadas visualmente quanto à presença de cremeação, precipitação, coalescência e separação ou não de fases das preparações.

4.6.2 Tamanho de partícula, índice de polidispersão e potencial zeta

Para as análises foram retiradas uma alíquota de 10 µL de cada amostra de emulsão e diluída 1000 vezes com água ultrapura (CARPENTER et al., 2016). A solução final foi homogeneizada com auxílio de um banho de ultrassom durante 1 minuto.

Desta solução foram feitas as análises de potencial zeta através da técnica microeletroforese doppler a laser, índice de polidispersão e tamanho de partícula através da técnica ELD (Espalhamento de Luz Dinâmico).

As medições foram realizadas a 25 °C e foram investigadas através de varreduras

automáticas com tempo de 60 s para estabilização da amostra. As análises foram feitas em triplicata e os valores expressam a média aritmética dos dados obtidos.

Após as medições e teste de resistência ao estresse mecânico, considerou como o BHL requerido pelo óleo, a emulsão com menor valor de tamanho de partícula, sem alteração do aspecto ao teste de estresse mecânico e com valores de potencial zeta e índice de polidispersão característicos de formulações estáveis.

4.7 Preparo e caracterização das nanoemulsões contendo ácido betulínico

As nanoemulsões foram preparadas conforme as quantidades descritas na Tabela 3 e conforme esquema mostrado na Figura 10.

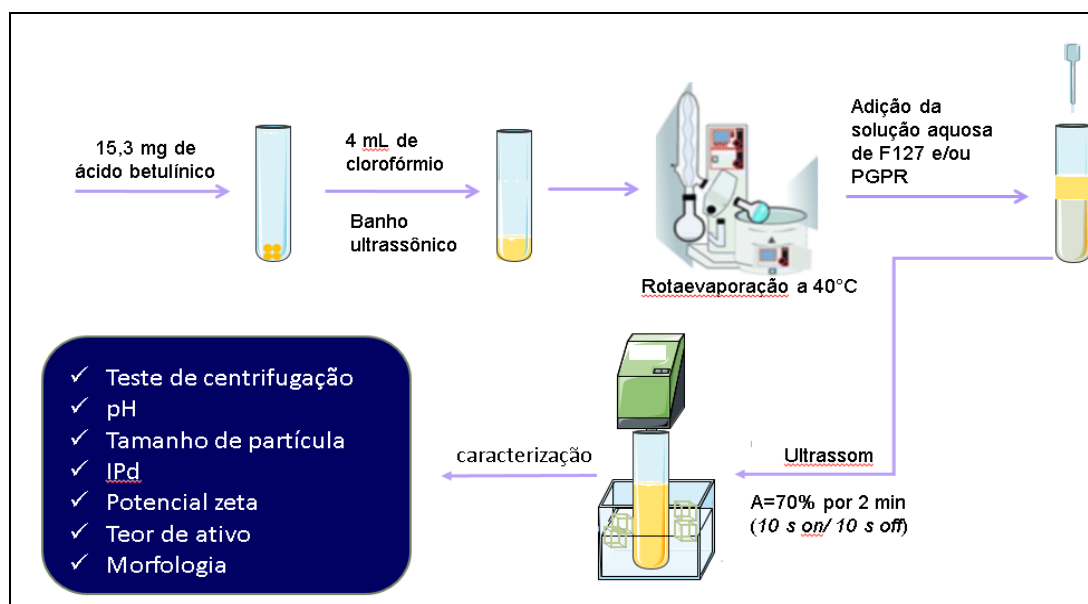
Tabela 3 – Formulações das nanoemulsões FF e FP

Formulação	Quantidade (g)				
	F127	PGPR	OL	Água	Ácido betulínico
FF	0,100	0	1,50	8,3847	0,0153
BFF	0,100	0	1,50	8,4000	0
FP	0,052	0,048	1,50	8,3847	0,0153
BFP	0,052	0,048	1,50	8,4000	0

Legenda: FF- Formulação contendo como tensoativo somente Pluronic F127; FP – Formulação contendo como tensoativos PGPR e Pluronic F127; BFF – Controle da formulação FF; BFP – Controle da formulação FP; OL – óleo de linhaça.

Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 10 – Esquema representativo do preparo das nanoemulsões



Fonte: Elaborado pelo autor.

Inicialmente o ácido betulínico foi solubilizado com o auxílio de um banho ultrassônico em 4 mL de clorofórmio e em seguida esta solução foi vertida sobre o óleo de linhaça em um tubo de Falcon e depois homogeneizado. A quantidade de ácido betulínico adicionada foi de 0,0153 g para que a quantidade real de ácido betulínico seja 0,0150 g considerando uma pureza de 98,13% do ativo. Na sequência o conteúdo foi rotaveaporado a 40°C sob pressão reduzida, a 100 rpm, por 4 h até que todo clorofórmio fosse removido. Posteriormente foi adicionado PGPR (formulação FP) e a solução aquosa contendo água e Pluronic F127. Em seguida a formulação foi submetida a sonicação em um processador ultrassônico Branson Sonifier W-450D com sonda, com amplitude de 70%, potência de 100-105 W, por 2 min 10 s on/ 10 s off em banho de gelo. A determinação do potencial hidrogeniônico (pH) foi realizada em triplicata com o auxílio de um pHmetro previamente calibrado, à temperatura de 25 ± 1 °C. Foi colocado em contato com a amostra diluída 1:10 (m/m) em água purificada, até estabilização da medida.

4.7.1 Tamanho de partícula, índice de polidispersão e potencial zeta

As análises de tamanho, potencial zeta e índice de polidispersão das formulações foram realizadas nas condições descritas na seção 4.6.2.

4.8 Quantificação do ativo

A análise da solução de ácido betulínico foi realizada em um cromatógrafo líquido de alta eficiência com detector UV-VIS, conforme método proposto e validado por Taralkar e Chattopadhyay (2012), porém se diferenciando pelo comprimento da coluna e vazão da fase móvel sendo necessária uma revalidação do método.

As figuras de mérito avaliadas para a validação foram: seletividade, linearidade, limite de detecção, limite de quantificação, recuperação e repetibilidade do método cromatográfico de acordo com a Resolução RDC nº166 de 2017 (ANVISA) e o documento orientativo DOQ-CGCRE-008 do INMETRO.

4.8.1 Preparo dos padrões

Foram preparadas de forma independente 6 padrões de ácido betulínico em metanol com correção da massa considerando 98,13% de pureza nas concentrações de 1, 5, 10, 20, 30 e 60 µg/mL para obter a curva de calibração.

4.8.2 Preparo da amostra

O ácido betulínico foi quantificado, após o método validado, nas formulações FP e FF por CLAE UV-VIS. 0,2000 g da nanoemulsão foi diluída a 10 mL em metanol obtendo uma concentração aproximada de 30 µg/mL para a leitura. A solução foi filtrada em filtro de 0,45 µm antes de ser injetada no cromatógrafo.

4.8.3 Condições cromatográficas

As condições cromatográficas foram: vazão de 1 mL/min à temperatura de 28 °C, fase móvel composta de acetonitrila e solução aquosa de ácido fosfórico pH 2,8, eluição no modo isocrático (80:20), volume de injeção de 20 µL e comprimento de onda de 210 nm.

4.8.4 Validação do método analítico

4.8.4.1 Seletividade

A seletividade de um método instrumental de separação é a capacidade de medir exatamente um composto em presença de outros componentes como impurezas, produtos de degradação e componentes da matriz (INMETRO, 2016) e deve ser demonstrada por meio da sua capacidade de identificar ou quantificar o analito de interesse, inequivocamente, na presença de componentes que podem estar presentes na amostra e/ou no solvente, como impurezas, diluentes e componentes da matriz (ANVISA, 2016).

Para determinar a seletividade do método foram injetadas as nanoemulsões sem o ativo (controle), as nanoemulsões FF e FP contendo o ativo e uma solução do padrão de ácido betulínico em metanol na mesma concentração das nanoemulsões FF e FP em triplicata. E foram identificados os tempos de retenção do ácido betulínico nas diferentes amostras e a observância da presença ou não de picos no mesmo tempo de retenção para o branco das nanoemulsões.

4.8.4.2 Linearidade

A linearidade de um método deve ser demonstrada por meio da sua capacidade de obter respostas analíticas diretamente proporcionais à concentração de um analito em uma amostra. No presente trabalho, a linearidade do método analítico foi avaliada construindo-se curvas analíticas, em triplicata, nas concentrações de 1 µg/mL, 5 µg/mL, 10 µg/mL, 20 µg/mL, 30 µg/mL e 60 µg/mL. A curva analítica foi obtida plotando-se um gráfico de concentração *versus* área.

Após a obtenção dos valores de área, foi determinada a variância em cada nível de concentração para a identificação de homocedasticidade (variâncias homogêneas) ou heterocedasticidade (variâncias heterogêneas) através do Teste C de Cochran (teste de homogeneidade de variâncias) que consiste na comparação entre um valor calculado através da razão entre o maior valor de variância e a soma de todas as variâncias, com um valor crítico tabelado e após confirmado o comportamento homocedástico obteve-se a equação da curva por regressão linear pelo método dos mínimos quadrados ordinários (MMQO).

Também foi calculado o coeficiente de determinação R^2 e plotado o gráfico de resíduos versus valores de ajuste. A confirmação correlação foi realizada pelo teste F ANOVA utilizando as ferramentas de análise VBA do *software Microsoft Excel 2016*.

4.8.4.3 Limite de detecção e limite de quantificação

Os limites de detecção (LD) e quantificação (LQ) foram determinados através do desvio padrão e do *slope* da curva de calibração através das equações 3 e 4:

$$LD = 3.3 DP/S \quad (\text{Equação 3})$$

$$LQ = 10 DP/S \quad (\text{Equação 4})$$

DP é o desvio padrão do intercepto-y e S é a média do slope das curvas de calibração.

4.8.4.4 Recuperação

Para o ensaio de recuperação fortificou-se os brancos das nanoemulsões com a mesma quantidade de ácido betulínico colocada nas formulações FF e FP. Após a quantificação, a recuperação foi calculada pela Equação 5:

$$\text{Recuperação (\%)} = C_1 - C_2 / C_3 \quad (\text{Equação 5})$$

C1: concentração do analito na amostra fortificada, C2: concentração do analito na amostra não fortificada e C3: concentração do analito adicionado à amostra fortificada.

4.8.4.5 Repetibilidade

A repetibilidade de uma medição é realizada num conjunto de condições, as quais incluem o mesmo procedimento, os mesmos operadores, o mesmo sistema de medição, as mesmas condições de operação e o mesmo local, assim como medições repetidas no mesmo objeto ou em objetos similares durante um curto período de tempo (INMETRO, 2016).

A repetibilidade foi expressa em termos de desvio-padrão obtido da triplicata da quantificação do ativo nas formulações FF e FP.

4.9 Eficiência de Encapsulação

A eficiência de encapsulação (EE) do ácido betulínico nas emulsões FF e FP foi determinada utilizando um filtro de centrifugação 3000 MWCO Vivaspin turbo 15 da Sartorius. A escolha do corte de 3000 MWCO deve-se a recomendação do fabricante de ser menor ou igual a metade do tamanho da espécie a ser retida (SARTORIUS, 2016) que no caso foram as cápsulas formadas com F127 com massa de aproximadamente 12500 daltons (JAGDALE et al., 2014).

Foram adicionados aproximadamente 0,5 g de emulsão no referido dispositivo e depois centrifugou-se a 4000 rpm durante 30 minutos (YU et al., 2017). De modo que o ácido betulínico encapsulado e o não encapsulado foram separados. Logo em seguida a solução contendo o material não encapsulado foi diluída com metanol na proporção 1:1 e analisada por CLAE. As análises foram realizadas em triplicata conforme Figura 11.

Figura 11 – Esquema representativo da determinação da EE



Fonte: Elaborada pelo autor.

A eficiência de encapsulação foi calculada a partir da Equação 6:

$$EE (\%) = (M/M_0) \times 100 \quad (\text{Equação 6})$$

M = quantidade encapsulada do ativo e M_0 = quantidade adicionada do ativo

4.10 Estudo de estabilidade coloidal

Amostras de nanoemulsões FF e FP (10 mL de cada) foram colocadas em frascos de vidro hermeticamente fechados e testadas em incubadora $25 \pm 2^\circ\text{C}$ e $45 \pm 2^\circ\text{C}$ em triplicata por três meses de acordo com metodologia utilizada por Teo et al. (2015) adaptada. A aparência física, o pH, o tamanho das partículas, quantificação do ativo, o índice de

polidispersão e o potencial zeta foram registrados para amostras em intervalos mensais 30, 60 e 90 dias.

4.11 Reologia

As propriedades reológicas das nanoemulsões foram determinadas usando geometrias de cone e placa (40 mm de diâmetro; ângulo do cone de 1° e *gap* de 27 µm) em reômetro AR 2000 (TA Instruments), o software utilizado foi o *Rheology Advantage Instrument Control* AR. A temperatura dos experimentos foi controlada por um *peltier* a 25 °C simulando condições ambientais. O fluxo das curvas foi obtido em triplicata no intervalo de taxa de cisalhamento de 5,314 1/s e 531,4 1/s. Foi aplicada a Lei da Potência para determinar o tipo de fluido através da Equação 7:

$$\tau = K\gamma^n \quad (\text{Equação 7})$$

Onde τ é a tensão de cisalhamento, γ é a taxa de cisalhamento, K é o índice de consistência e n é o índice de fluxo (HOSMER et al., 2013).

4.12 Avaliação do potencial citotóxico *in vitro*

A avaliação do potencial citotóxico das formulações FF, FP, dos brancos FF e FP, do ácido betulínico e do óleo de linhaça contendo ácido betulínico foi realizada no Laboratório Nacional de Oncologia Experimental localizado no Núcleo de Pesquisa e Desenvolvimento de Medicamentos da UFC.

O potencial citotóxico foi determinado pelo Teste do MTT em células normais de L-929 (fibroblastos de murino), em células tumorais de HCT-116 (carcinoma colorretal), em células tumorais NCI-H460 (carcinoma pulmonar), HL-60 (leucemia) e em células tumorais de SNB-19 (glioblastoma) após 72 h de incubação como descrito a seguir.

4.12.1 Cultura de células

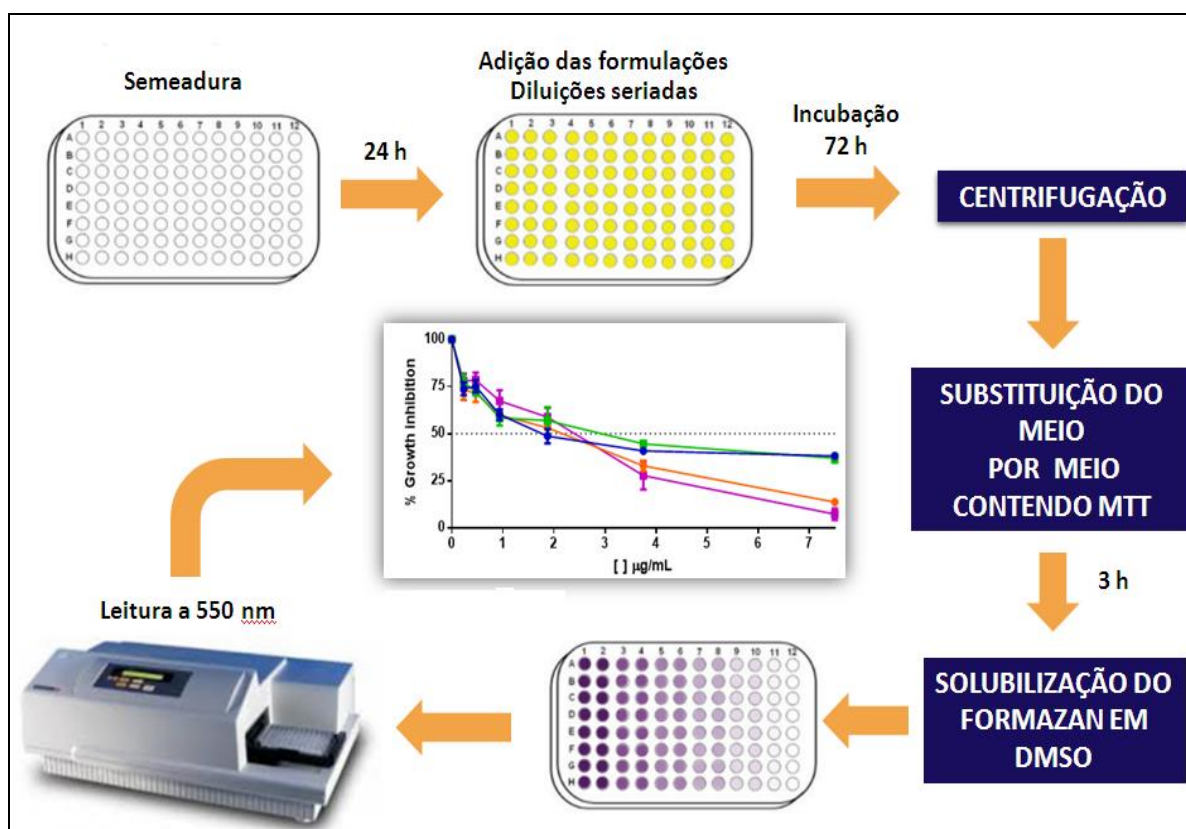
As células foram mantidas em RPMI 1640 ou DMEM (Gibco®), suplementados com 10% de soro bovino fetal e 1% de antibióticos (100U/mL penicilina, 100U/mL streptomomicina, 1mM), mantidos em forno a 37 ° C e atmosfera contendo 5% CO₂.

4.12.2 Teste MTT

O teste de MTT foi desenvolvido por Mosmman em 1983, baseia-se na capacidade da succinato desidrogenase, uma enzima do Ciclo de Krebs ativa em mitocôndrias de células viáveis, em converter o sal de tetrazolium (brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il) - 2,5-difeniltetrazolio, ou MTT), que é hidrossolúvel e de cor amarelada, em cristais de formazan, que são de cor púrpura. Essa técnica tem a capacidade de analisar a viabilidade e o estado metabólico da célula. A quantificação do crescimento celular foi realizada com base no número de células capazes de converter o MTT em formazan.

A Figura 12 mostra um diagrama esquemático do procedimento do teste do MTT.

Figura 12 – Diagrama esquemático do procedimento do teste do MTT



Fonte: Elaborado pelo autor.

As células foram semeadas em placas de 96 poços em concentração de $0,7 \times 10^5$ células/mL para a linhagem HCT-16, $0,7 \times 10^6$ células/mL, para as linhagens SNB-19, $0,3 \times 10^6$ células/mL para NCI-H460 e HL-60; e 7×10^4 para a linhagem L-929.

Após 24 h, a substância livre foi dissolvida em DMSO (1%) e no óleo e foram adicionadas às placas para obter concentração 5 µg/mL em todas as cepas testadas. As formulações das nanoemulsões (com e sem ativo) foram adicionadas às placas para obter concentração de 7,5 µg/mL. Após a adição das amostras as placas foram incubadas por 3 dias (72 h). Posteriormente as placas foram centrifugadas e o meio foi substituído por meio fresco (200 µL) contendo 0,5 mg/mL de MTT. Após 3 horas, o produto de MTT formazan foi dissolvido em 150 µL de DMSO, e a absorbância lida a 550 nm em um leitor múltiplo. Todos os ensaios foram realizados em seis repetições.

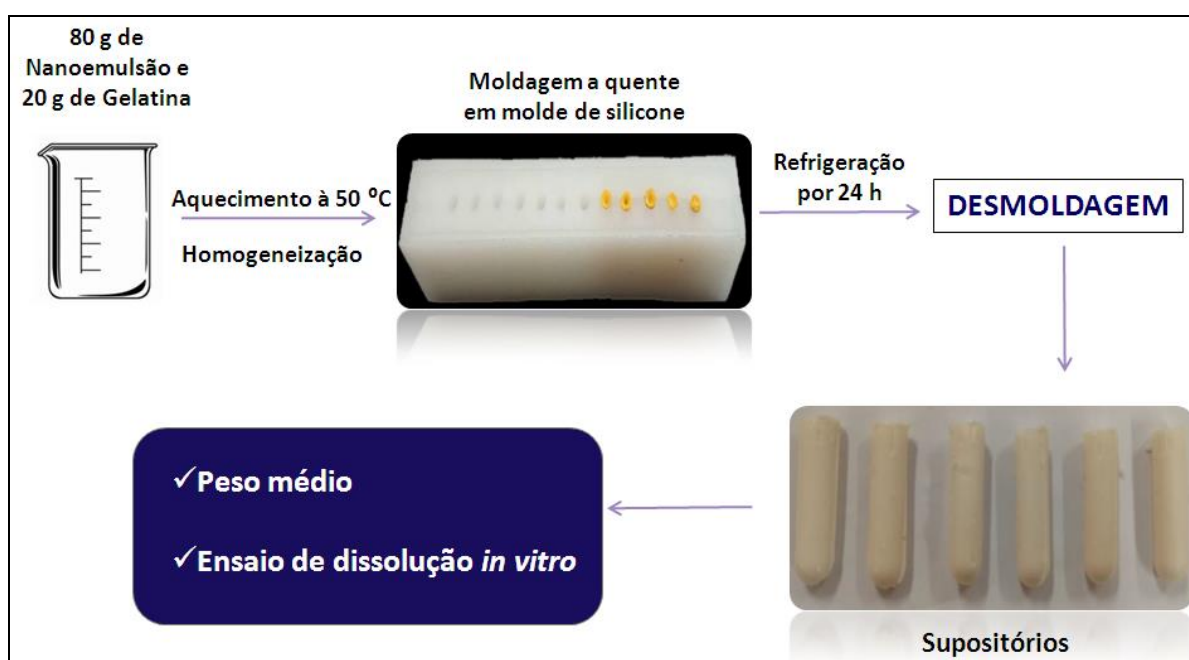
As amostras foram testadas duas vezes em triplicata cada uma, em diluições seriadas para a determinação de suas IC₅₀ (concentração capaz de inibir 50% do crescimento celular).

Foram registradas as porcentagens de inibição x log da concentração e determinadas suas IC₅₀ e seus respectivos intervalos de confiança (95%) a partir de regressão não-linear, utilizando o programa *Prisma* versão 6.0 (*GraphPad Software*).

4.13 Preparo dos supositórios

Os supositórios foram preparados a partir de 80 g da nanoemulsão com 20 g de gelatina, a mistura foi submetida ao aquecimento à 50 °C sob agitação branda. Posteriormente a massa foi vertida sobre moldes de silicone para supositórios. O molde foi mantido em refrigeração por 24 horas e os supositórios foram desmoldados, pesados e submetidos ao ensaio de dissolução *in vitro* conforme mostrado na Figura 13.

Figura 13 – Esquema representativo do procedimento de preparo dos supositórios



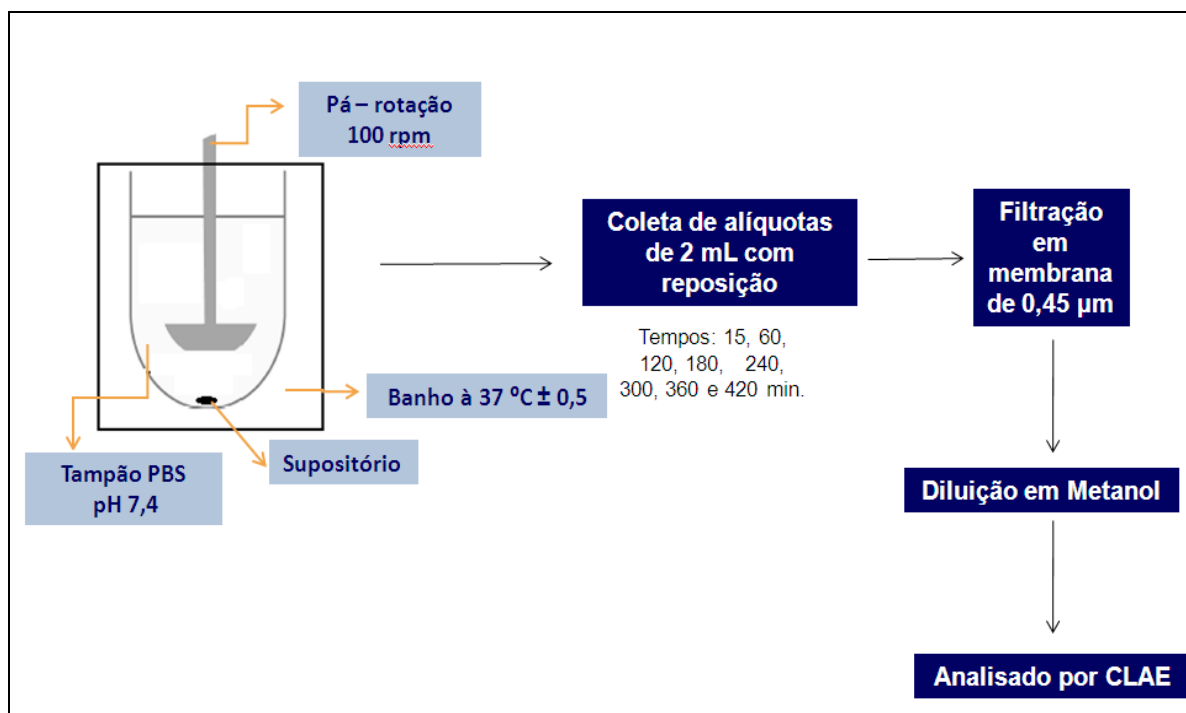
Fonte: Elaborado pelo autor.

4.14 Ensaio de dissolução dos supositórios

O procedimento para determinação da cinética de dissolução (Figura 14) foi realizado com 5 supositórios de cada formulação, que foram dispostos individualmente em cada aparato tipo pá do aparelho dissolutor, tendo como meio de dissolução 200 mL de solução de tampão PBS pH 7,4, em temperatura de $37 \pm 0,5$ °C. O teste foi realizado de maneira comparativa nas velocidades de rotação de 100 rpm, de acordo com o método farmacopeico americano adaptado utilizando o aparato II (USP, 2012).

Para a obtenção do perfil de dissolução, coletou-se e filtrou-se em filtro de $0,45 \mu\text{m}$ alíquotas de 2 mL nos tempos de 15, 60, 120, 180, 240, 300, 360 e 420 minutos. Em seguida, analisou-se todas as amostras em CLAE conforme método de quantificação do ácido betulínico descrito anteriormente.

Figura 14 – Esquema representativo do ensaio de dissolução dos supositórios



Fonte: Elaborado pelo autor

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Extração e caracterização do óleo de linhaça

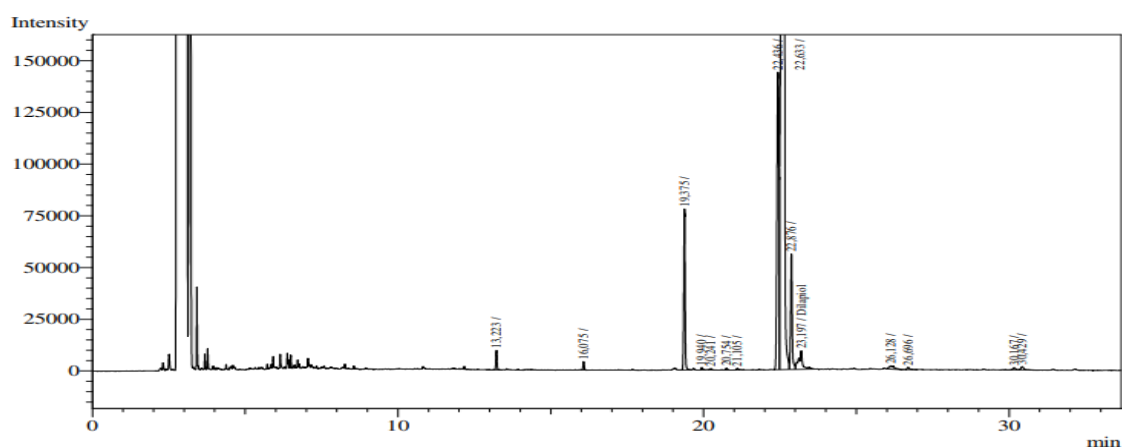
Após a extração por prensagem a frio e purificação do óleo a partir de 3000 gramas de semente de linhaça dourada, obteve-se 756 g de óleo de linhaça correspondendo a um rendimento de 25,2 %. Este rendimento foi similar ao relatado por Pradhan et al. (2010) que por prensagem em prensa contínua do tipo *expeller* obteve um rendimento de 25,5%. Ressalta-se ainda que o mesmo autor comparou vários métodos de extração, concluindo que o método por prensagem, apesar de não possuir o maior rendimento, é o que origina óleo de melhor qualidade considerando os valores de potencial antioxidante, índice de peróxidos e índice de acidez.

As principais vantagens do método de extração por prensagem são a ausência de contaminantes químicos durante o processo e a menor degradação do óleo por não o submeter ao aquecimento.

5.1.1 Perfil de ácidos graxos do óleo de linhaça

O perfil de ácidos graxos do óleo de linhaça extraído foi determinado a partir do cromatograma (Figura 15) dos ésteres metílicos. Observa-se no cromatograma que o ácido graxo majoritário é o ácido linolênico, seguido do ácido linoleico e do ácido oleico.

Figura 15 – Cromatograma CG-DIC dos ésteres metílicos do óleo de linhaça



Fonte: Elaborado pelo autor.

O perfil dos principais ácidos graxos juntamente com a porcentagem relativa e tempo de retenção para o óleo de linhaça são mostrados na Tabela 4.

Tabela 4 – Perfil de ácidos graxos do óleo de linhaça extraído

Ácidos Graxos	Tempo de retenção (min)	Média (%)	DP (%)
Ácido linolenico (18:3)	22,63	74,16	0,62
Ácido linoleico (18:2)	22,43	13,62	0,28
Ácido palmítico (16:0)	19,37	4,84	0,07
Ácido esteárico (18:0)	22,87	4,12	0,05

Fonte: Elaborado pelo autor.

O principal ácido graxo encontrado foi o ácido linolênico (18:3) e o ácido graxo saturado de maior proporção foi o ácido palmítico (C16: 0). Estes dados estão próximos aos

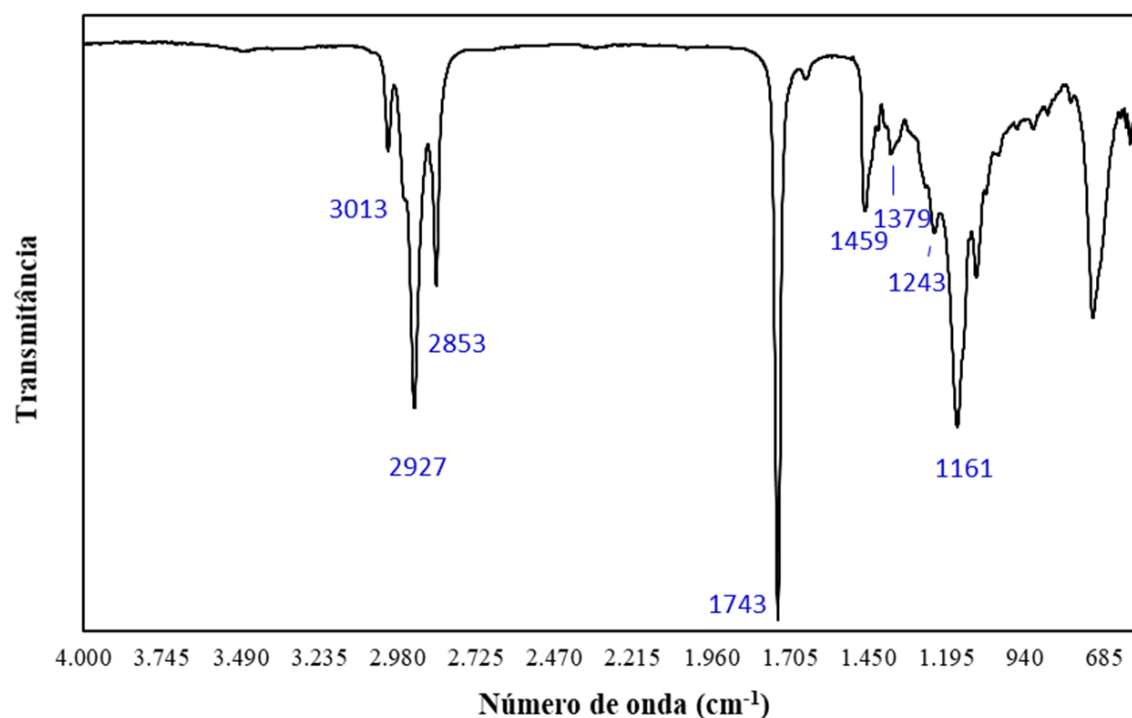
valores encontrados por Chauham et al. (2015) que encontrou 73% de ácido linolênico, 12% de linoleico, 7% de palmítico e 6% de esteárico utilizando também uma coluna apolar.

5.1.2 Espectroscopia de absorção no infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR)

O espectro de FTIR do óleo de linhaça extraído está ilustrado na Figura 16, as atribuições referentes a cada banda estão identificadas na Tabela 5.

Para o óleo de linhaça, observa-se que as frequências fundamentais estão de acordo com o trabalho publicado por Lewinska et al. (2015). Uma proeminente banda da carbonila em 1743 cm^{-1} e das vibrações da ligação C–O em 1243 cm^{-1} e 1161 cm^{-1} são diagnósticos para a ligação éster no triacilglicerol. A deformação axial de C–C(=O)–O dos ésteres de ácidos α,β -insaturados provoca o aparecimento de mais de uma banda entre 1300 cm^{-1} e 1160 cm^{-1} .

Figura 16 – Espectro de FTIR do óleo de linhaça



Fonte: Elaborado pelo autor.

Tabela 5 – Atribuições das principais bandas no infravermelho do óleo de linhaça

Posição da banda (cm ⁻¹)	Valor de Referência (LEWINSKA et al., 2015)	Atribuições
3013	3010	v C–H <i>cis</i>
2927	2925	va C–H (CH ₂)
2853	2854	vs C–H (CH ₂)
1743	1746	v C=O (éster)
1459	1463	δs (CH ₂)
1379	1375	δs CH ₃
1243	1238	va C–C(=O)–O (éster)
1161	1162	v C–C(=O)–O (éster)

Legenda: δ – deformação angular; v – deformação axial; a – assimétrica e s – simétrica

Fonte: LEWINSKA et al. (2015, com adaptações)

Os espectros de FTIR podem fornecer também informações sobre o estado de oxidação do óleo. As ligações duplas dos ácidos insaturados no óleo reagem com o oxigênio no ar e entre si para formar uma rede polimérica. O ácido oleico, como um ácido monoinsaturado, pode ser oxidado somente em temperaturas elevadas, enquanto os ácidos poliinsaturados, como os ácidos linolênico e linoleico, predominantes no óleo de linhaça, sofrem rápida oxidação mesmo à temperatura ambiente. Os hidroperóxidos de alila, constituem os produtos primários de oxidação. As ligações duplas dos compostos insaturados do óleo permanecem, mas podem mudar de posição ou configuração de sua forma original durante a reação de oxidação, com a formação de hidroperóxidos. (JUITA et al., 2012)

No entanto, observa-se no espectro do óleo de linhaça extraído a ausência de bandas que indicam que o óleo se encontra em processo de oxidação que posicionam-se em torno de 854 cm⁻¹ referente à vibração do grupo =CH₂, em 900 cm⁻¹ referente a ligações duplas decorrentes de isomerização *cis-trans* e como banda alargada acima de 3000 cm⁻¹.

5.1.3 Análises físico-químicas do óleo de linhaça

Avaliando-se os principais índices analíticos do óleo de linhaça, conforme mostrado na Tabela 6 obtém-se a confirmação da identidade do óleo extraído, observa-se que o índice de iodo encontrado é de 171,5 g I₂/100 g e encontra-se bem próximo ao valor da literatura. Este índice avalia o grau de insaturação do óleo e é expresso em número de

centigramas de iodo absorvido pela amostra (% iodo absorvido), o valor encontrado confirma o alto grau de insaturação do óleo de linhaça. O alto grau de insaturação do óleo de linhaça o torna suscetível a oxidação durante a estocagem (TANSKA et al, 2016).

Tabela 6 - Resultados das análises físico-químicas do óleo de linhaça

Parâmetros	Unidade	Resultados	Valores de Referência	Referência
Índice de Acidez	mg KOH/g	$0,53 \pm 0,03$	0,80	Popa et al (2012)
Índice de Saponificação	mg KOH/g	$191,46 \pm 0,55$	190	Popa et al (2012)
Índice de Iodo	g I ₂ /100 g	$171,52 \pm 0,85$	177	Popa et al (2012)
Índice de Peróxidos	meqO ₂ /1000 g	$1,19 \pm 0,07$	0,95	Popa et al (2012)
Densidade Relativa à 20 °C	g/cm ³	$0,9302 \pm 0,0026$	0,9349	Zhang et al (2011)
Viscosidade Dinâmica à 20 °C	mPa.s	$45,878 \pm 0,057$	45	Mota e Souza (2007)

Fonte: Elaborado pelo autor.

O índice de saponificação do óleo de linhaça utilizado neste trabalho foi aproximado do valor apresentado por Popa et al. (2012). Este índice representa a quantidade de álcali (hidróxido de potássio) em miligrama necessária para saponificar 1 g da amostra. Essa proximidade de valores apresentado nos dois estudos pode concluir que são óleos com característica de cadeias carbônicas similares.

O índice de acidez e o índice de peróxido são importantes parâmetros utilizados para avaliar a qualidade do óleo quanto ao estado de conservação. O índice de acidez corresponde ao número de mg de KOH para neutralizar os ácidos graxos livres em 1 grama de amostra. O valor obtido na análise do óleo de linhaça extraído é considerado baixo sendo o valor permitido pela ANVISA (BRASIL, 2005) de no máximo 4,0 mg KOH/g para óleos prensados a frio e não refinados, valor acima ao encontrado neste trabalho. O índice de peróxido é um indicativo de grau de oxidação, o valor máximo permitido pela ANVISA (BRASIL, 2005) é de 15 meqO₂/1000g para óleos prensados a frio e não refinados. O valor de índice de peróxido encontrado ficou distante do máximo permitido, podendo-se concluir que o óleo não se encontrava oxidado.

A densidade relativa encontrada para o óleo de linhaça foi de $0,9302 \pm 0,0143$, este valor é similar ao encontrado na literatura que cita a densidade relativa de 0,9349. Conforme Walia et al. (2013) a densidade é influenciada pelo grau de insaturação dos ácidos graxos.

O valor encontrado de viscosidade dinâmica apresenta-se próximo ao valor encontrado por Mota e Sousa (2007) para o óleo de linhaça, a viscosidade é um parâmetro importante tanto para a caracterização de um óleo quanto para a previsão da estabilidade de uma emulsão óleo em água.

As viscosidades das duas fases, isto é, fase dispersa e contínua têm uma forte influência no resultado do processo de redução de tamanho das gotículas de óleo em uma emulsão. As viscosidades das duas fases não podem ser muito distantes, para óleos muito viscosos (fase dispersa), pode-se reduzir o tamanho das gotículas aumentando a viscosidade da fase contínua (SINGH et al, 2017).

5.2 Caracterização do ácido betulínico

5.2.1 Ressonância Magnética Nuclear de ^1H e ^{13}C

Os espectros de RMN ^1H e ^{13}C do ácido betulínico adquiridos confirmam o perfil de uma estrutura triterpênica.

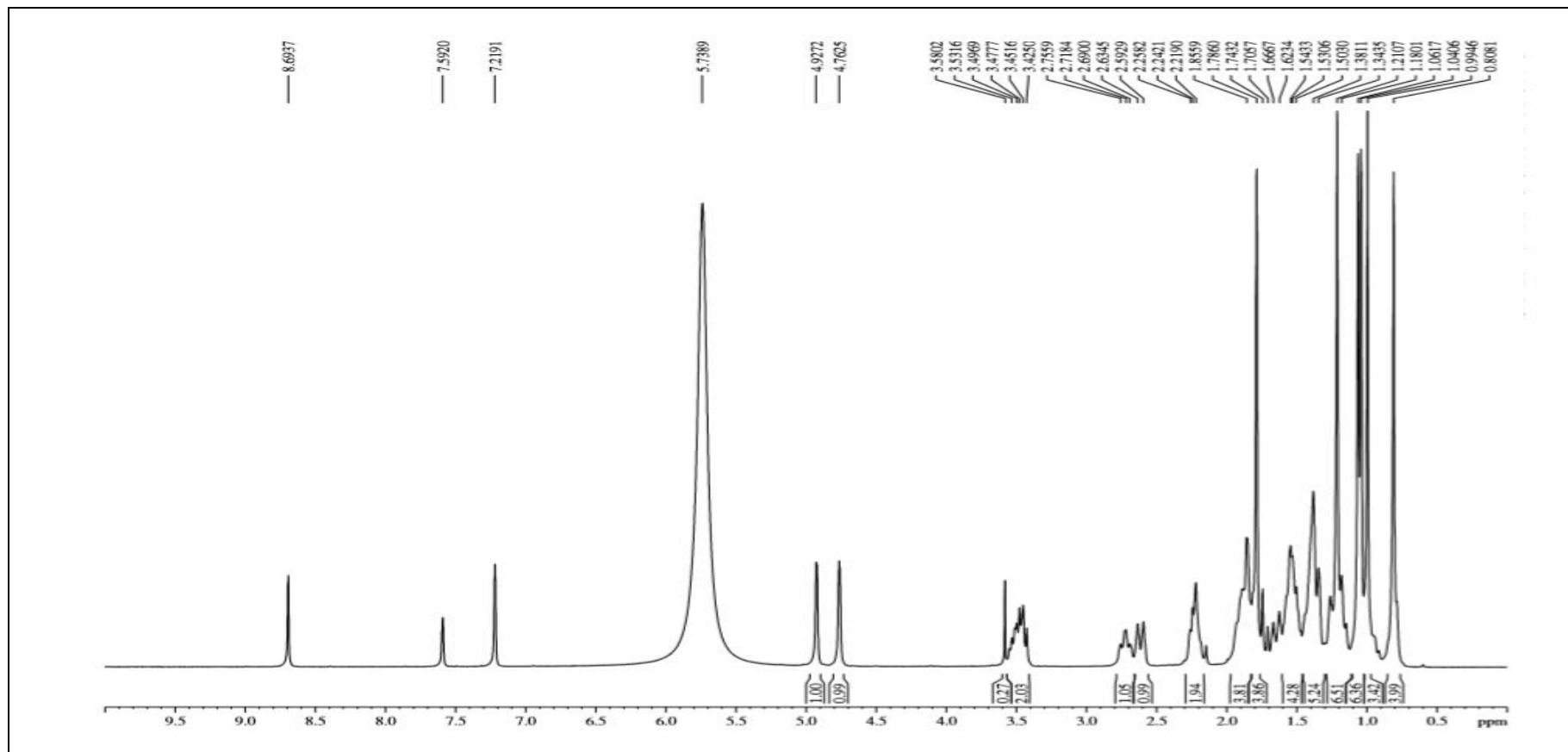
O espectro de RMN ^1H (Figura 17) mostrou sinais para 6 grupos metila em δ_{H} (3H, s), sinais em 4,92 (1H, s, H-29 α) e 4,76 (1H, s, H-29 β) típico de um grupo metileno sp^2 ($=\text{CH}_2$) conforme mostrado na Tabela 7. (2016) encontra-se os mesmos deslocamentos obtidos neste trabalho.

Tabela 7 – Dados dos espectros de RMN ^1H para o ácido betulínico

^1H	δ	Valor de Referência (WANG et al, 2016)	Multiplicidade/Atribuições
3	3,42	3,40	m/1H
13	2,69	2,68	t/1H
16	2,59	2,58	d/1H
21	2,21	2,21	m/1H
29β	4,92	4,91	s/1H
29α	4,76	4,74	s/1H
Me-27	1,04	1,05	s/3H
Me-26	1,04	1,03	s/3H
Me-30	1,78	1,77	s/3H
Me-23	1,18	1,19	s/3H
Me-24	0,99	0,94	s/3H
Me-25	0,80	0,80	s/3H

Legenda: s- singleto, d-dubleto, m-multipeto, t-tripeto.

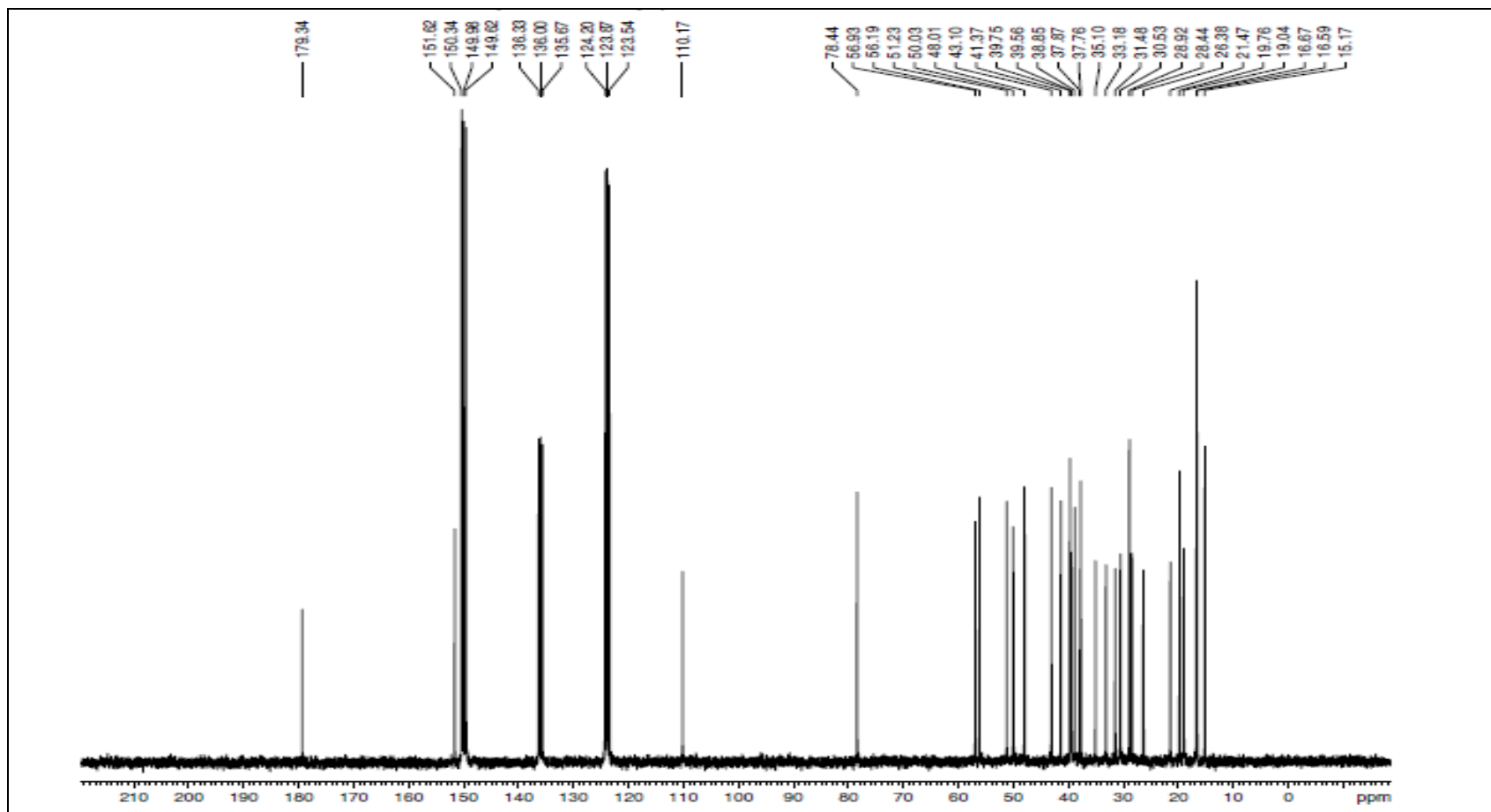
Os sinais registrados δ (deslocamentos) 7,21, δ 7,59 e δ 8,69 correspondem a fração não deuterada da Piridina- d_5 . Observa-se um sinal intenso em δ 5,73 correspondente ao hidrogênio da água presente no solvente. Em comparação com valores de deslocamentos obtidos do espectro de RMN 1H do ácido betulínico de Wang et al. (2016).

Figura 17 – Espectro de RMN ^1H do ácido betulínico

Fonte: Elaborado pelo autor

O espectro de RMN de ^{13}C do ácido betulínico (Figura 18) mostrou sinais para 29 carbonos conforme valores mostrados na Tabela 7, característicos de triterpenos. Além disso, a presença dos carbonos sp^2 em (δ 110,17) e (δ 151,62), um oximetínico (δ 78,44) e também um carbono carbonílico (δ 179,34), confirma a estrutura do triterpeno ácido.

Os deslocamentos obtidos estão de acordo com os de Castanhede-Filho et al. (2017) como mostra a Tabela 8.

Figura 18 - Espectro de RMN de ^{13}C do ácido betulínico

Fonte: Elaborado pelo autor.

Tabela 8 – Dados dos espectros de RMN ^{13}C para o ácido betulínico

^{13}C	δc	δc (CASTANHEDE FILHO et al., 2017)
1	39,6	39,5
2	28,4	28,4
3	78,4	78,3
4	39,8	39,7
5	56,2	56,1
6	19,0	18,9
7	35,1	35,0
8	41,4	41,3
9	51,2	51,1
10	37,7	37,7 e 37,8
11	21,5	21,4
12	26,4	26,3
13	38,9	38,9
14	43,1	43,0
15	30,5	30,4
16	33,1	33
17	56,9	56,8
18	50,0	49,9
19	48,0	47,9
20	151,6	151,5
21	31,4	31,4
22	37,7	37,7 e 37,8
23	28,7	28,8
24	16,6	16,5
25	16,7	16,6
26	-	16,6
27	15,2	15,1
28	179,3	179
29	110,2	110,1
30	19,7	19,6

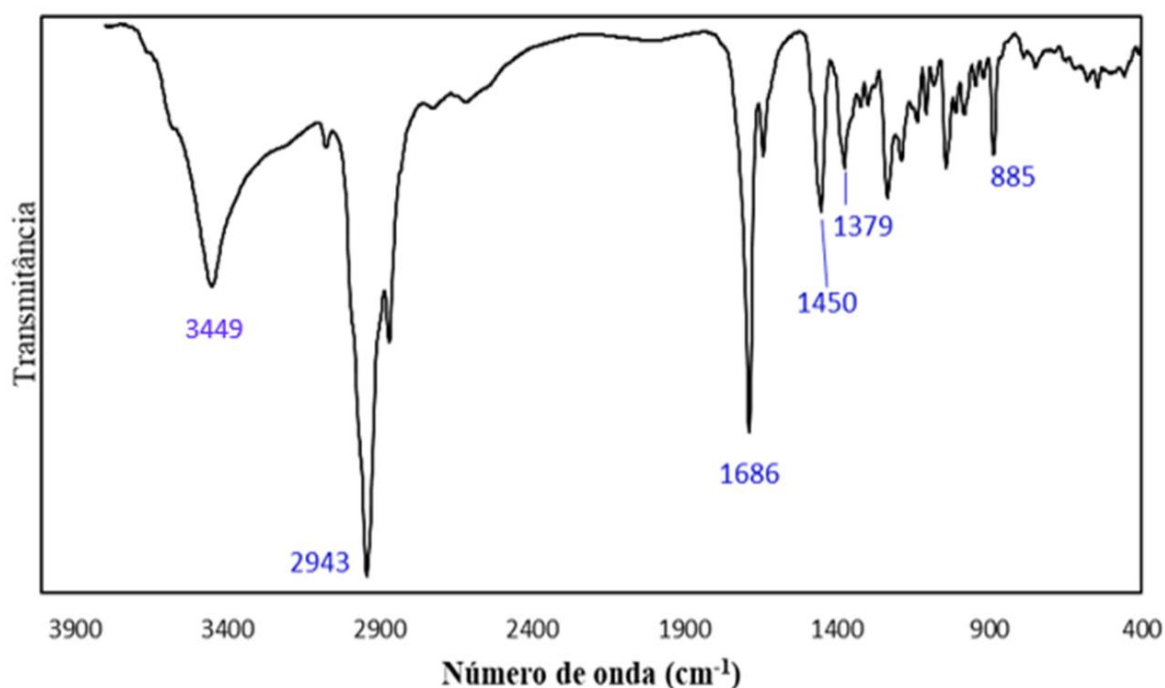
Legenda: δc : deslocamento em ppm dos carbonos

Fonte: Adaptado de Castanhede Filho et al. (2017)

5.2.2 Espectroscopia de absorção no infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR)

O espectro de FTIR (Figura 19) do ácido betulínico apresentou um perfil de absorção típico de estruturas terpênicas. Duas bandas, uma intensa e larga com máximo de absorção em 3449 cm^{-1} característica do estiramento de hidroxila; um grupo de bandas de absorção para estiramentos C-H na região de 2943 cm^{-1} , cuja intensidade indica a presença de uma grande quantidade de carbono sp_3 . Além disso, observou-se uma banda fina e intensa em 1686 cm^{-1} , correspondente a absorção de estiramento de ligação (C=O) do ácido carboxílico.

Figura 19 – Espectro de FTIR do ácido betulínico



Fonte: Elaborado pelo autor.

Na Tabela 9 observa-se que os resultados obtidos por Pai et al (2011) do espectro de FTIR do ácido betulínico são semelhantes aos obtidos nesta pesquisa.

Tabela 9 – Atribuições das principais bandas de transmitância no infravermelho para o ácido betulínico

Posição da banda (cm ⁻¹)	Valor de Referência (PAI et al, 2011)	Atribuições
3449	3446	v O–H
2943	2943	v C–H
1686	1668	v C=O
1450	1452	δ _s C–H (-CH ₂ -)
1379	1378	δ _s C–H (-CH ₃)
1043	1038	va C–OH
885	883	δ _{sp} =CH ₂ terminal

Legenda: δ – deformação angular; v – deformação axial; a – assimétrica, ρ – vibração fora do plano e s – simétrica

Fonte: PAI et al (2011) adaptado

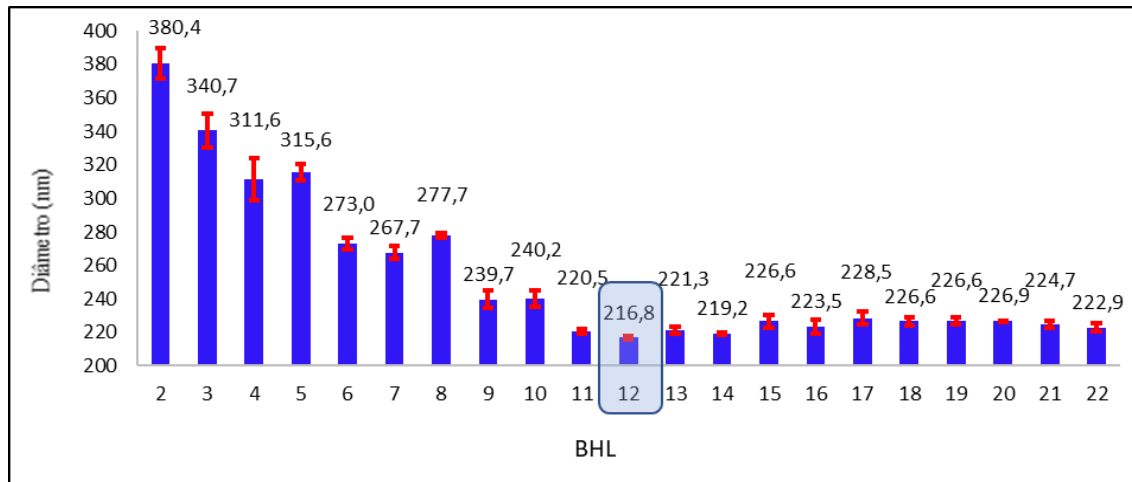
5.3 Desenvolvimento da formulação das nanoemulsões

A fim de se obter sistemas nanoemulsionados, a determinação do BHL do óleo de linhaça constitui a etapa inicial de estudo.

Para obter o valor do BHL do óleo de linhaça, fez-se necessário a formulação de 22 emulsões, através da utilização de um tensoativo bastante hidrofílico, como o Pluronic F127 (BHL 22), e de um tensoativo bastante lipofílico, o PGPR (BHL 1-2), com a justificativa de se obter uma faixa bem variável de BHL na qual, a partir dos resultados da caracterização físico-química, a emulsão que apresentou melhor estabilidade – em relação ao seu tamanho de partícula, índice de polidispersão e potencial zeta – possui seu valor de BHL correlacionado com o BHL do óleo em questão (ORAFIDYA; OLADIMEJ, 2002).

De acordo com o gráfico (Figura 20), a emulsão BHL 12 apresentou o menor tamanho de partícula em comparação com as demais.

Figura 20 – Valores de diâmetro *versus* BHL das emulsões



Fonte: Elaborado pelo autor.

A formulação com BHL 1 logo após a sua preparação separou as fases não sendo possível fazer medições de diâmetro e potencial zeta.

Observa-se que, para valores de BHL maiores ou igual a 11, o aumento do tamanho de partícula não sofre tanta variação, embora tenha um aumento do BHL.

Segundo Fredrick et al. (2010), o diâmetro de partículas é um dos fatores que contribui para processos de instabilidade, como o *creaming* (sedimentação ou ascensão), fundamentado na equação da lei de Stokes (Equação 8):

$$V = \frac{2R^2 g \Delta\rho}{9\eta} \quad (\text{Equação 8})$$

V= velocidade de sedimentação; R = raio da gotícula; g = aceleração da gravidade; $\Delta\rho$ = diferença entre as densidades da fase interna e da fase contínua; η = viscosidade da fase contínua da emulsão.

A Tabela 10 demonstra as características de PDI (índice de polidispersão) e PZ (potencial zeta) das emulsões.

Tabela 10 – Resultados de Potencial Zeta, Índice de Polidispersão e Resistência ao estresse mecânico

HLB	PZ (mV)	PDI	Estresse mecânico
2	-55,4 ±1,1	0,304 ±0,010	cremeação
3	-47,8 ±0,8	0,355 ±0,003	cremeação
4	-48,0 ±2,2	0,302 ±0,000	cremeação
5	-45,8 ±0,7	0,420 ±0,002	cremeação
6	-44,1 ±2,0	0,340 ±0,003	cremeação
7	-45,2 ±0,9	0,310 ±0,002	cremeação
8	-45,3 ±2,1	0,206 ±0,000	cremeação
9	-41,6 ±2,4	0,211 ±0,005	sem alteração
10	-40,0 ±1,1	0,150 ±0,000	sem alteração
11	-40,0 ±1,3	0,090 ±0,003	sem alteração
12	-39,2 ±0,4	0,090 ±0,002	sem alteração
13	-35,8 ±1,8	0,150 ±0,001	sem alteração
14	-35,0 ±1,8	0,160 ±0,000	sem alteração
15	-33,5 ±2,2	0,130 ±0,002	sem alteração
16	-29,7 ±1,7	0,224 ±0,002	sem alteração
17	-25,9 ±1,1	0,198 ±0,006	sem alteração
18	-25,8 ±1,5	0,213 ±0,003	sem alteração
19	-24,7 ±2,1	0,150 ±0,002	sem alteração
20	-25,0 ±1,0	0,097 ±0,001	sem alteração
21	-21,5 ±0,7	0,115 ±0,002	sem alteração
22	-16,3 ±1,0	0,099 ±0,005	sem alteração

Fonte: Elaborado pelo autor.

O PDI, fornece informações sobre a homogeneidade da distribuição dos tamanhos, segundo NOBBMANN (2014), as nanopartículas que possuem valor de PDI entre 0 e 0,1 podem ter distribuição de tamanho de partícula estreitamente monodispersa, moderadamente polidispersa entre 0,1 e 0,4 ou amplamente polidispersa quando o PDI > 0,4.

Observa-se que entre BHL 2 e 7 as emulsões apresentaram valores entre 0,420 e 0,302 de PDI e no teste de estresse mecânico estas mesmas emulsões apresentaram cremeação. A emulsão com menor valor de diâmetro (BHL 12) apresentou um PDI de 0,09 sendo classificada como estreitamente monodispersa.

No teste de estresse mecânico somente as emulsões com BHL de 2 a 8 apresentaram cremeação, observa-se que estas emulsões possuem valores mais altos de tamanho de partícula em relação as demais.

O potencial zeta reflete o potencial de superfície das partículas, este potencial é influenciado pelas mudanças na interface com o meio dispersante, em razão da dissociação de grupos funcionais na superfície da partícula ou da adsorção de espécies iônicas presentes no meio aquoso de dispersão (MAGENHEIM e BENITA, 1991). O potencial zeta pode ser usado também como indicador de estabilidade, pois uma carga mais alta impede a agregação de partículas dificultando a ocorrências dos fenômenos de instabilidade. Quando o valor em módulo do potencial zeta é alto, as forças repulsivas predominam em relação às atrativas de London, fazendo com as gotículas fiquem dispersas no sistema. Por outro lado, quando o valor do potencial zeta em módulo é baixo, as forças atrativas predominam em relação às repulsivas, favorecendo a aproximação das partículas, podendo resultar em instabilidade da preparação (LIEBERMAN et al., 1988).

Como regra geral, valores absolutos de PZ acima de 30 mV proporcionam boa estabilidade e acima de 60 mV, excelente estabilidade. Cerca de 20 mV fornecem apenas estabilidade de curto prazo, valores no faixa de -5 mV a +5 mV indica agregação rápida. Isto é válido para tensoativos de baixa massa molar e estabilização elétrica pura, mas não para tensoativos de alta massa molar como os usados neste trabalho (Pluronic F127), que atuam principalmente por estabilização estérica. Neste caso, PZ valores de apenas 20 mV em módulo ou muito menor podem fornecer estabilidade. (HONARY e ZAHIR, 2013)

O uso de tensoativo não iônico resulta também na formação da dupla camada elétrica ao redor da gotícula dispersa. Segunda a literatura, tal observação se deve ao pH e à força iônica da fase aquosa (AHMAD et al.,1996; HO e AHMAD, 1999; HSU e NACU, 2003). A carga elétrica mensurada em nanoemulsões estabilizadas com tensoativos não iônicos tem sido atribuída à adsorção dos íons H_3O^+ (em pH baixo) ou OH^- (em pH alto) da água (HO e AHMAD, 1999).

Com base nestas informações, pode-se concluir que as emulsões propostas possuem boa estabilidade (menor possibilidade de agregação) quanto ao potencial zeta, cujos valores apresentaram variação de -24,7 mV a -55,4 mV. Além desta constatação, é possível verificar

que todos os valores de potencial zeta encontrados são negativos. A emulsão com BHL 12 apresentou um valor de potencial zeta médio igual a -39,2 mV.

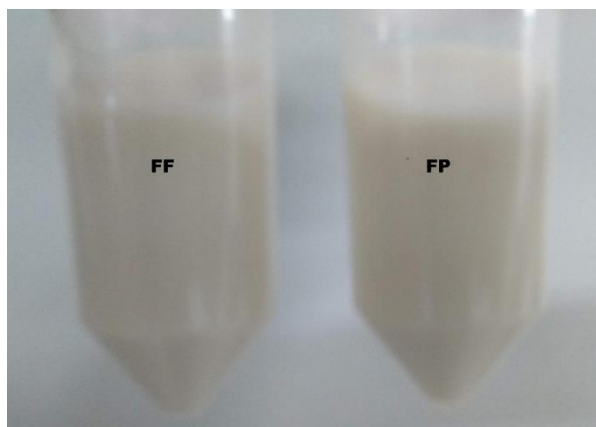
Pode-se concluir que, o valor requerido para o óleo de linhaça baseado nos resultados encontrados para cada emulsão referente ao tamanho de gotículas, potencial zeta e índice de polidispersão, situa-se em BHL12.

5.4 Caracterização das nanoemulsões FF e FP

5.4.1 Potencial Hidrogeniônico (pH)

Após o preparo das nanoemulsões contendo o ácido betulínico (Figura 21), foram realizadas medidas de pH à 25°C como mostra a Tabela 11.

Figura 21 – Nanoemulsões FF e FP preparadas



Fonte: Autor.

Tabela 11 – Resultados da caracterização das formulações FF e FP

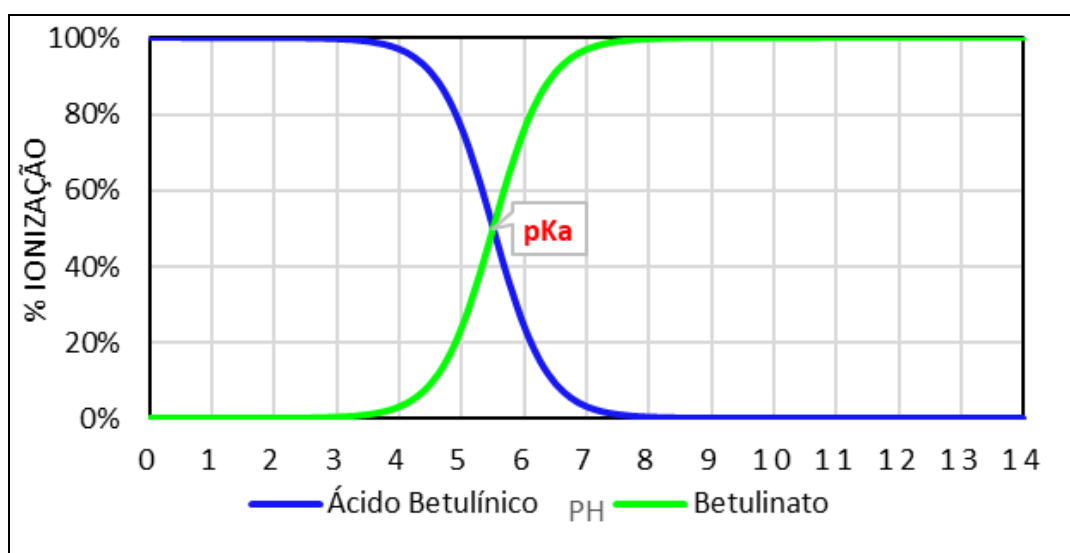
Formulação	pH	Diâmetro (nm)	PDI	Potencial zeta (mV)	Quantificação do ativo (µg/mL)
FF	5,89 ±0,01	221,1 ±1,3	0,118 ±0,004	-36,5 ± 1,1	1466
FP	5,98±0,02	219,7 ±0,8	0,105 ±0,002	-43,4 ± 1,6	1472

Fonte: Elaborado pelo autor.

A verificação do valor do pH é importante para determinar a estabilidade das nanoemulsões. Alterações acentuadas de pH indicam a ocorrência de reações químicas ou alterações microbiológicas que podem comprometer a qualidade do produto final.

A regulação do pH está relacionada com a estabilidade do ativo e com o pKa. Considerando que o pKa do ácido betulínico é 5,5 (DU e CHEN, 2009), e que nas formulações FF e FP são respectivamente 5,89 e 5,98, o ácido não encapsulado ou quando liberado da fase oleosa para a aquosa encontrar-se-á próximo a 75% da fração livre na forma de betulinato (forma iônica), como mostra o diagrama de distribuição das espécies para o ácido betulínico (Figura 22). Porém, o medicamento quando em contato com o fluido estomacal, a forma protonada e neutra do ácido betulínico predomina no ambiente altamente ácido do estômago (pH 1-3).

Figura 22 – Diagrama de distribuição das espécies do ácido betulínico



Fonte: Elaborado pelo autor.

5.4.2 Tamanho de Partícula e índice de Polidispersão

Considerando o desvio padrão das medições de tamanho médio de partícula como mostra a Tabela 9, os resultados apresentaram-se semelhantes para as formulações FF e FP com tamanhos de 221,1 nm e 219,7 nm, respectivamente.

As aplicações médicas das nanopartículas são fortemente dependentes do tamanho de partícula. Na maioria dos casos, essa dependência está relacionada aos requisitos e características dos sistemas biológicos estudados (RAHN-CHIQUÉ e URBINA-VILLALBA, 2016).

O tamanho de partícula também está relacionado com a estabilidade física das emulsões, quanto menor as partículas dispersas, mais estável o sistema. Por outro lado, quanto

mais rápido as partículas aumentam de tamanho, mais instável o sistema se torna (MORAIS, et al., 2006; URSICA et al., 2005). Cavazos-Garduno et al. (2015), obtiveram nanoemulsões contendo ácido betulínico estáveis com valores de tamanho de partícula próximos a 200 nm.

O valor do índice de polidispersão (PDI) é adimensional e representa a distribuição do tamanho de partícula. Quanto mais próximo de zero for o valor, mais homogêneo é o tamanho da população das partículas, e quanto mais próximo de um, mais heterogêneo é o tamanho da população de partículas (COELHO et al., 2016). A partir dos índices de polidispersão, pode-se prever um futuro fenômeno de instabilidade coloidal das nanoemulsões, no qual partículas com tamanhos maiores englobam partículas menores até a coalescência (separação das fases), este fenômeno é denominado de amadurecimento de Ostwald.

De acordo com a classificação adotada por NOBBMANN (2014), as formulações FF e FP podem ser consideradas moderadamente polidispersas, apresentando distribuição do tamanho de partículas em intensidade de forma monomodal.

5.4.3 Potencial Zeta

Os valores de potenciais zeta das formulações FF e FP apresentaram-se negativos (Tabela 9) indicando estabilidade eletrostática além da instabilidade estérica fornecida pelo Pluronic F127. Para nanoemulsões estabilizadas por polímeros de alta massa molecular e valores de potenciais zeta próximos a 20 mV em valor absoluto são consideradas estáveis (HONARY e ZAHIR, 2013).

Para aplicações biológicas, a estabilização estérica é mais vantajosa do que a estabilização eletrostática, uma vez que a estabilidade das partículas é mantida mesmo na presença de cargas existentes (KIM et al., 2008).

5.5 Quantificação do Ativo

5.5.1 Validação do método de quantificação do ácido betulínico

5.5.1.2 Seletividade

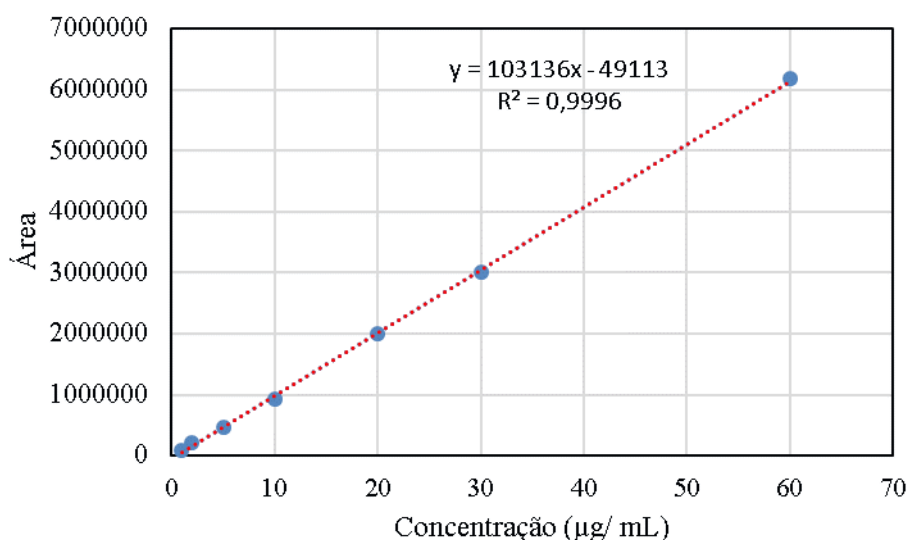
Os tempos de retenção para o ácido betulínico puro foram de 9,69 minutos, na

formulação FF foi de 9,64 minutos e na formulação FP foi de 9,58 min. Os brancos das formulações FF e FP também foram injetados e não foram registrados picos 9 e 10 min, ou seja, o método identifica somente o ácido betulínico nesse tempo de retenção.

5.5.1.3 Linearidade

A curva analítica obtida com os valores médios de área é apresentada na Figura 23.

Figura 23 - Curva analítica para o ácido betulínico



Fonte: Elaborado pelo autor.

A linearidade da curva analítica na faixa de 1 µg/mL a 60 µg/mL foi obtida a partir do ajuste de regressão linear ($R^2 = 0,996$). Segundo a ANVISA (2017), o coeficiente de correlação linear para validação de métodos analíticos para fármacos deve ser igual ou superior a 0,99. Sendo assim, o valor de R^2 obtido na análise do ácido betulínico pelo método CLAE-UV utilizado obedece aos limites estabelecidos.

A equação da curva média foi $y = 103136x - 49113$ obtida por regressão linear pelo método dos mínimos quadrados ordinários.

Os dados foram validados pela análise de igualdade de variâncias através do Teste de Cochran para verificar se a curva possuía comportamento homocedástico ou heterocedástico, que demonstrou comportamento homocedástico com um valor de $C_{cal} (0,37) < C_{tab} (0,52)$ para um nível de 95% de confiança considerando 6 concentrações e 3 réplicas para cada

concentração, ou seja, as variâncias não se diferem muito para as concentrações da curva e o modelo de regressão linear pelo método dos mínimos quadrados ordinários é adequado.

O teste ANOVA para regressão linear realizado através da ferramenta de análise VBA do *software* Microsoft Excel 2016 confirmou a correlação obtendo os seguintes valores de F calculado e tabelado (tabela 10), observando-se que o valor de F calculado é muito maior do que o valor de F tabelado para 1 e 16 graus de liberdade (GL), podendo-se rejeitar a hipótese nula e afirmar que existe correlação, confirmando assim a linearidade. Para confirmar a correlação o F de significância tem que ser menor que o nível de significância de 0,05, observa-se na Tabela 12 que o valor obtido foi muito menor que este valor.

Tabela 12 - Resultados do teste ANOVA em nível de significância de 0,05

	<i>GL</i>	<i>F</i>	<i>F de significância</i>	<i>F crítico</i>
Regressão	1	47889,98	3,04092E-29	4,493998478
Resíduo	16			
Total	17			

Fonte: Elaborado pelo autor.

5.5.1.4 Limite de quantificação e limite de detecção

Os limites de detecção e quantificação foram determinados a partir das equações 3 e 4, obtendo os valores de 0,038 µg/mL e 0,116 µg/mL, respectivamente, como mostra a Tabela 13. O limite de quantificação é importante para a determinação da Eficiência de Encapsulação pois são quantificados valores muito pequenos.

Tabela 13 – Resultados de LD e LQ

Inclinação média	desvio do intercepto	LD (µg/mL)	LQ (µg/mL)
103136	1200	0,038	0,116

Fonte: Autor

5.5.1.5 Recuperação

A recuperação foi testada na concentração de doseamento do fármaco na nanoemulsão em triplicata. A média dos valores obtidos ficou em 99,54% para o branco da

formulação FF fortificado e 100,02% para o branco da formulação FP fortificado, esses resultados estão na faixa de recuperação para a concentração de 1500 µg/mL que pode variar entre 95% e 105% (INMETRO, 2016).

5.5.1.6 Repetibilidade

O desvio padrão relativo da quantificação de seis réplicas de cada formulação foram 3,1% e 4,3% para as formulações FF e FP respectivamente. Estes valores estão de acordo com os valores de Horwitz (INMETRO, 2016) 5,6% no máximo.

5.5.2 Aplicação do método validado na quantificação do ativo nas formulações

A partir do método validado, a formulação FP apresentou uma concentração do ativo de 1466 µg/mL \pm 45,4 e a formulação FF 1472 µg/mL \pm 63,3. Estes valores correspondem a 97,7% e 98,1% do doseamento teórico para as nanoemulsões FF e FP respectivamente, porém considerando-se o desvio padrão do método podem ser considerados semelhantes.

5.6 Eficiência de Encapsulação

De acordo com a metodologia de Eficiência de Encapsulação usada neste estudo espera-se que o ácido betulínico encapsulado na nanoemulsão fique retido na porção superior do filtro de centrifugação, enquanto a porção contendo o ácido betulínico não encapsulado escoar para a porção inferior do filtro de centrifugação.

Para calcular a Eficiência de Encapsulação do princípio ativo nas nanoemulsões, foi necessário quantificar a porção do ácido betulínico presente na porção inferior do dispositivo de centrifugação.

Considerando o limite de quantificação do método de 0,116 µg/mL e que não foi possível visualizar o pico do ácido betulínico não encapsulado, pode-se afirmar que as Eficiências de Encapsulação (EE) para as formulações FF e FP foram maiores que 99,99%.

Dehelean et al. (2011) encontrou valores acima de 90% de eficiência de encapsulação em nanoemulsões de ácido betulínico em óleo de linhaça, estabilizadas com fosfatidilcolina do ovo, utilizando um filtro de ultracentrifugação com o mesmo corte utilizado neste estudo (3000 Da).

O alto índice de EE das emulsões, deve estar associado à forte interação intermolecular existente do ativo com o núcleo oleoso, como também pela sua alta hidrofobicidade e pela formação de uma camada interfacial rígida formada pelo Pluronic F127.

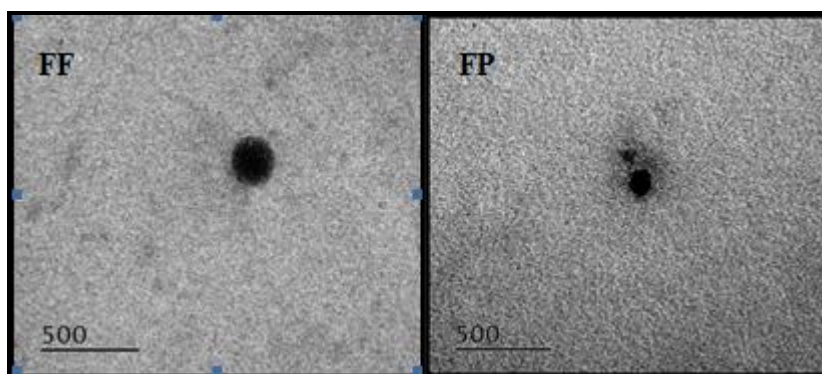
5.7 Morfologia

A morfologia das nanoemulsões foi investigada através de estudos de Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET).

A micrografia da nanoemulsão FF demonstrou gotas esféricas na faixa nanométrica de aproximadamente 250 nm estando esse valor próximo ao obtido por ELD.

Porém, a micrografia da nanoemulsão FP não mostrou gotículas perfeitamente esféricas, somente gotículas com bordas irregulares, com diâmetro aproximado de 160 nm e com agregados próximos as gotículas, esta observação pode estar relacionada com a presença do PGPR e conseqüentemente a algum fenômeno de instabilidade ou cristalização do ativo na fase oleosa como mostra a Figura 24.

Figura 24 – Imagens de MET das nanoemulsões FF e FP



Fonte: Autor

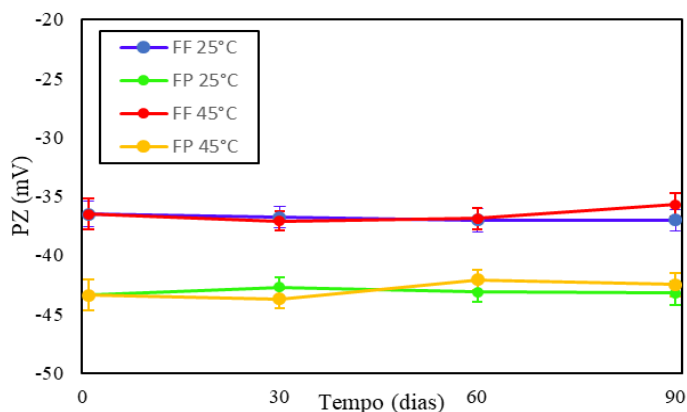
5.8 Estudo de estabilidade

As formulações FF e FP, inicialmente apresentavam os valores de Potenciais Zeta de -36,5 mV e -43,4 mV para as formulações FF e FP, respectivamente.

Observando-se a Figura 25, identifica-se que a emulsão FF apresentou o mesmo

valor de PZ ao final de 90 dias nas temperaturas de 25°C e 45°C, considerando o desvio padrão das medições, da mesma forma foi identificado para a formulação FP.

Figura 25 - Variação do PZ à 25°C e 45°C

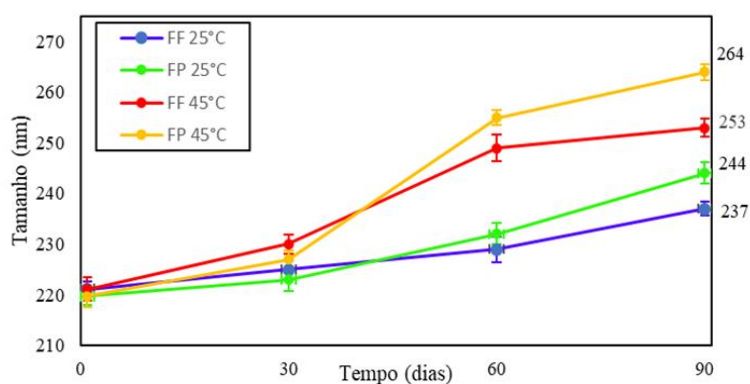


Fonte: Elaborado pelo autor.

No entanto, em relação a variação entre o 1º dia e o 90º dia, também não foram observadas alterações significativas dos valores de potencial zeta. Este fato pode ser explicado pela inexpressiva variação de pH durante os 90 dias. O pH está relacionado ao valor de potencial zeta, quanto maior o pH mais negativo se apresenta o PZ, e quanto menor o pH tem-se valores menos negativos de PZ.

Os resultados de tamanho de partícula após 90 dias (Figura 26) revelam um aumento no tamanho para as formulações FF e FP nas temperaturas testadas.

Figura 26 - Variação do tamanho de partícula à 25°C e 45°C



Fonte: Elaborado pelo autor.

Porém, identifica-se um aumento mais pronunciado, nas temperaturas testadas, para

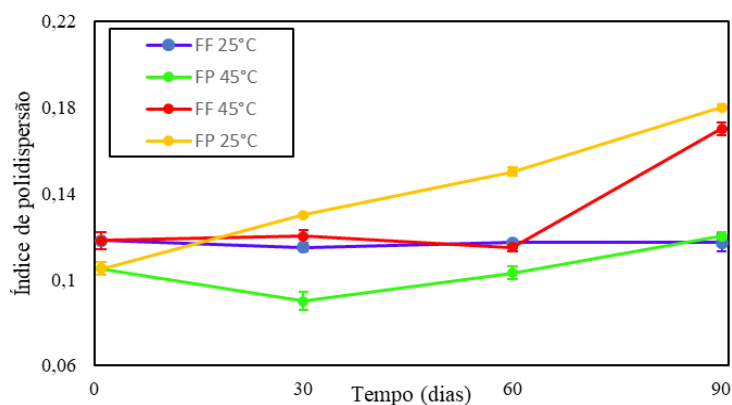
a formulação FP, que possui uma menor quantidade de Pluronic F127 e que contém PGPR. A formulação FF que contém maior quantidade de Pluronic F127 e não contém PGPR, apresentou uma variação menor em relação a formulação FP, acredita-se que este fato possa estar relacionado a estabilização estérica do F127.

Observa-se que a alteração em relação ao valor inicial de tamanho é maior com o aumento da temperatura para as duas formulações. Porém mesmo com as alterações observadas quanto ao tamanho de partícula, visualmente as formulações se mantiveram visualmente estáveis com valores máximos de tamanho de 264 nm para a formulação FP e 253 nm para a formulação FF.

O tamanho de partícula desempenha um papel crucial no tempo de circulação no sangue, partículas com tamanho menor podem evadir-se do reconhecimento do sistema fagocítico mononuclear (JAIN, FERNANDES e PATRAVALE, 2010).

Os índices de polidispersão à 25 °C para as formulações FF e FP não sofreram variações, conforme ilustrado na Figura 27, em relação ao estado inicial considerando-se o desvio padrão. Porém a 45 °C, foi observado um aumento significativo do PDI para a formulação FP (variação de PDI = + 0,06) em relação a FF (variação de PDI = +0,04).

Figura 27 - Variação do PDI à 25 °C e 45 °C



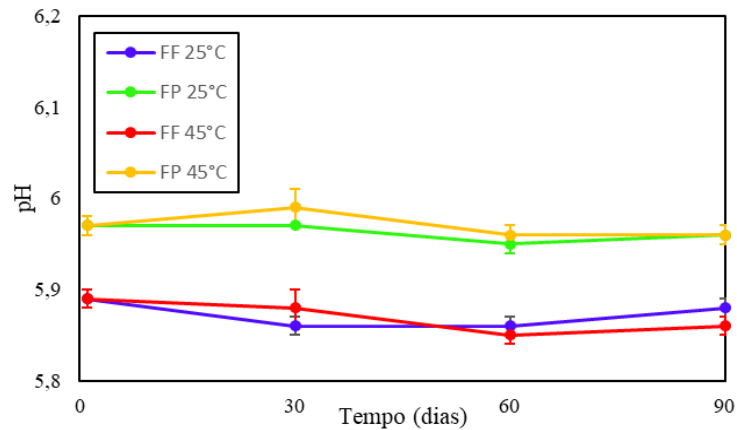
Fonte: Elaborado pelo autor.

Alterações no pH podem diminuir o potencial eletrostático, facilitando o processo de coalescência dos glóbulos lipídicos resultando em instabilidade da formulação, recomenda-se que o pH de formulações para nanopartículas apresente-se entre 5 e 7 (CASTAGNARO et al., 2013).

Neste estudo foi observado que os valores de pH se mantiveram constantes como

mostra a Figura 28 para ambas formulações e nas temperaturas testadas sugerindo que não houve alteração microbiológica e química, esta observação da constância do pH foi observada pela ausência de variação dos potenciais zeta.

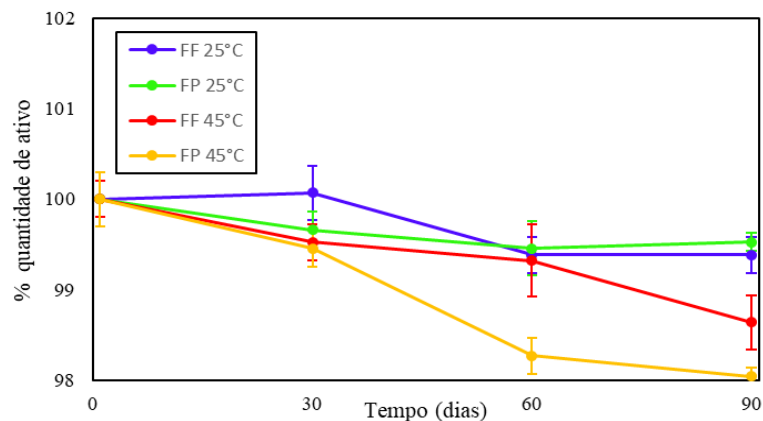
Figura 28 - Variação do pH à 25 °C e 45 °C



Fonte: Elaborado pelo autor.

Observa-se na Figura 29 que as formulações FP possuem uma variação maior do que as formulações FF em relação a quantidade de ativo na temperatura de 45 °C. Na temperatura de 25 °C não houve diferença considerando o desvio padrão.

Figura 29 - Variação do percentual do ativo à 25 °C e 45 °C



Fonte: Elaborado pelo autor.

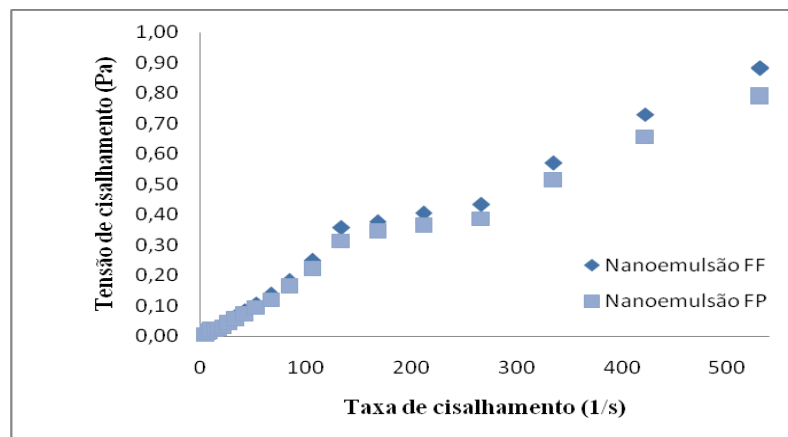
Porém, a variação do % do ativo quantificado em relação ao valor inicial sofreu redução de 1,36% e 1,96% para as formulações FF e FP.

5.9 Reologia

O entendimento da reologia de um fluido é necessário para as operações unitárias na indústria farmacêutica, para a funcionalidade do medicamento e para o uso do paciente de uma forma farmacêutica adequada ao meio onde será aplicado.

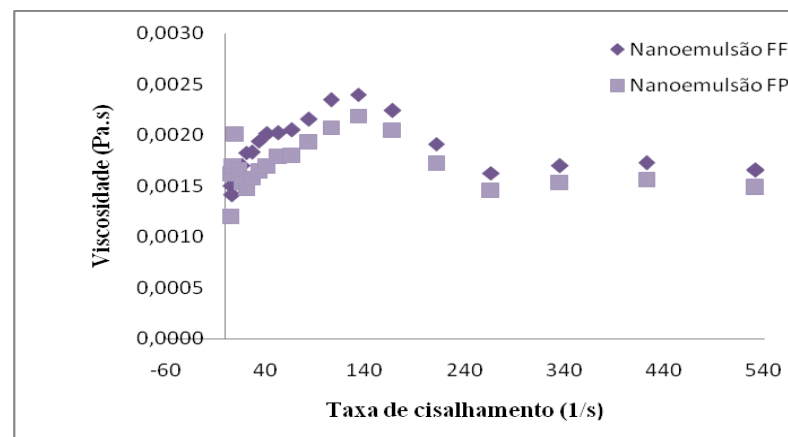
A partir da observação do comportamento de um fluido em uma curva de fluxo (taxa de cisalhamento em função da tensão de cisalhamento) e do comportamento da viscosidade com o aumento da taxa de cisalhamento, é possível identificar se o fluido é Newtoniano ou não-Newtoniano. As Figuras 30 e 31 revelam o comportamento das emulsões FF e FP a 25°C.

Figura 30 – Curvas de tensão em função da taxa de cisalhamento à 25 °C



Fonte: Elaborado pelo autor

Figura 31 – Curvas de viscosidade em função da taxa de cisalhamento à 25 °C



Fonte: Elaborada pelo autor

Ajustando ao modelo da Lei da Potência obtém-se os valores de índice de

comportamento de escoamento (n), índice de consistência (K) e R^2 (Tabela 14).

Tabela 14 – Valores obtidos do ajuste ao modelo da Lei da Potência

	k	n	R²
FF	0,001242	0,9894	0,9987
FP	0,006517	0,9094	0,9979

Fonte: Elaborado pelo autor

Os fluidos não-Newtonianos apresentam valor de n diferente de 1; sendo que, para o fluido pseudoplástico, o índice de comportamento do escoamento (n) é menor que 1 e a viscosidade aparente diminui com o aumento da taxa de deformação. O inverso ocorre para fluido dilatante: o índice de comportamento do escoamento (n) é maior que 1 e a viscosidade aparente aumenta com a taxa de deformação. Através dos valores obtidos conclui-se que as duas formulações apresentam comportamento pseudoplástico.

As curvas obtidas refletem um comportamento não-Newtoniano. Observa-se que a viscosidade das duas formulações depende fortemente da taxa de cisalhamento até 266 s^{-1} , o que pode ser explicado pelo fato das forças existentes entre as partículas em baixas taxas de cisalhamento serem mais pronunciadas do que as forças hidrodinâmicas impostas pelo cisalhamento (Wulff-Pérez et al, 2012). Wulff-Pérez e colaboradores observaram no estudo reológico de várias formulações de nanoemulsões que, conforme a taxa de cisalhamento aumenta, a contribuição hidrodinâmica prevalece e as curvas de viscosidade de cisalhamento das formulações se aproximam, pois possuem tamanho de partícula semelhantes. Este fato que também foi observado neste trabalho com as formulações FP e FF. Os mesmos pesquisadores também observaram, entre várias formulações preparadas com diferentes tipos de tensoativos, que o uso de Pluronic fornece emulsões com estrutura tridimensional mais forte.

As viscosidades apresentaram valores baixos (0,0016 e 0,0014 Pa.s), os fatores que podem determinar a ordem desta grandeza são: viscosidade da fase contínua, fração volumétrica da fase dispersa, viscosidade da fase dispersa, tamanho médio das gotículas e distribuição do tamanho das gotículas, taxa de deformação, natureza e concentração do agente emulsificante e temperatura (PAL et al., 1992).

5.10 Avaliação do potencial citotóxico

A eficácia de drogas antineoplásicas é a sua capacidade de suprimir a proliferação de células cancerosas. Substâncias com valores de IC_{50} , para linhagens celulares tumorais, menores que 5 $\mu\text{g/mL}$ em 72 horas são consideradas substâncias com boa atividade citotóxica. O MTT é um método amplamente utilizado para avaliar a taxa proliferativa (RAMZI et al., 2015).

As amostras testadas foram: AB (ácido betulínico puro), ABL (ácido betulínico em óleo de linhaça), FP (nanoemulsão FP com ácido betulínico), FF (nanoemulsão FF com ácido betulínico), BFP (branco da nanoemulsão FP) e BFF (branco da nanoemulsão FF).

As nanoemulsões e o ácido betulínico livre mostraram efeito antiproliferativo em células cancerosas. O ácido betulínico composto (AB) apresentou alta atividade citotóxica em todas as linhagens tumorais testadas com IC_{50} variando de 1,3 a 8,9 μM . Enquanto a mistura de óleo de linhaça + ácido betulínico (ABL) não mostrou citotoxicidade na concentração máxima testada.

Ao avaliar as nanoemulsões, aquelas com e sem o princípio ativo apresentaram inibição com IC_{50} variando de 3,2 a 16,69 μM nas linhagens HCT116, NCI H460, HL-60 e SNB 19.

Os resultados obtidos dos valores de IC_{50} estão descritos na Tabela 15.

Tabela 15 – Atividade citotóxica após 72 horas de incubação

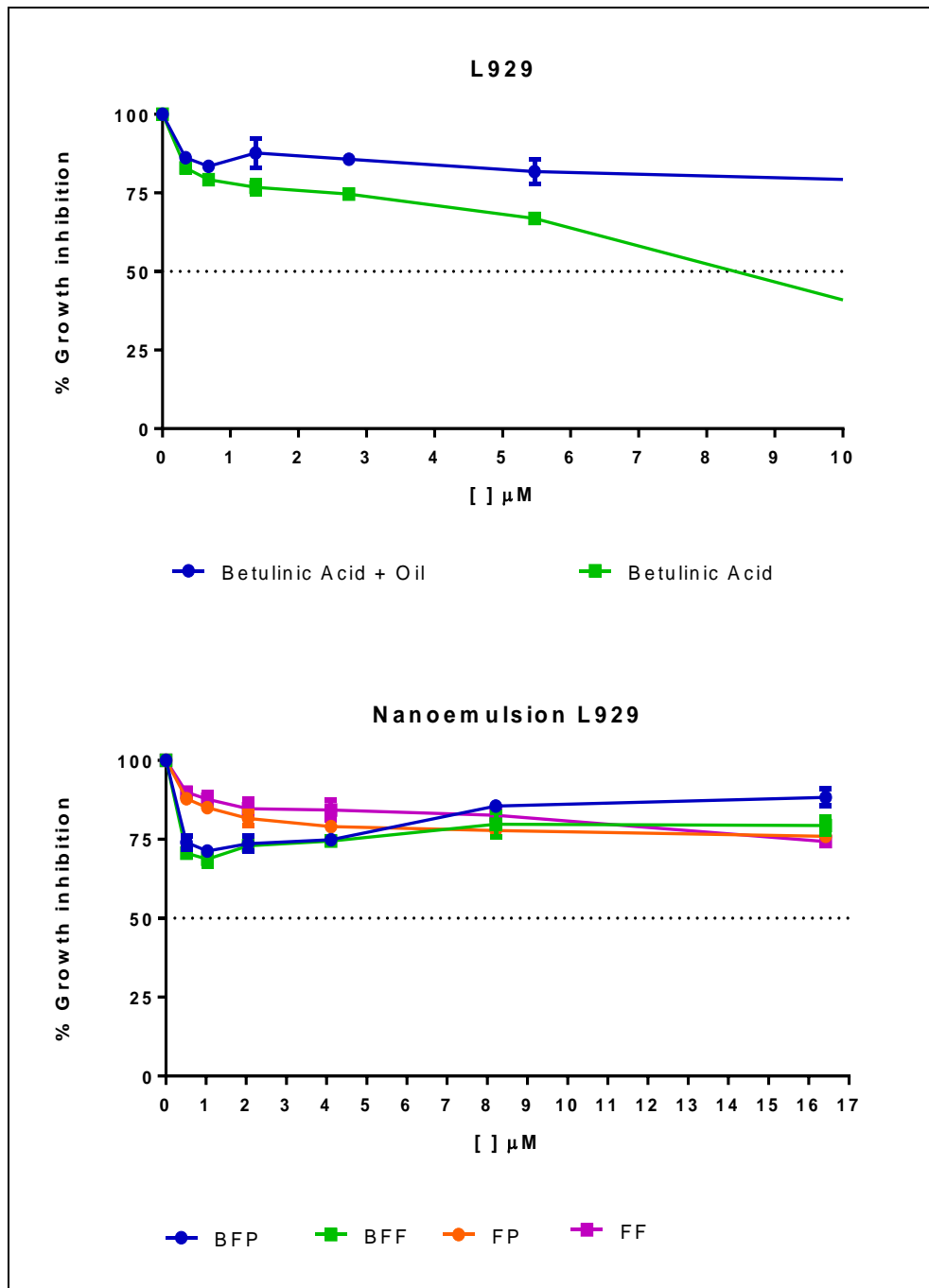
Compostos	IC ₅₀ µM (µg/mL) nas linhagens testadas				
	HCT 116	NCI-H460	SNB 19	HL-60	L929
AB	3,42 (1,56) [2,75-4,2]	1,3 (0,6) [1,03-1,54]	3,44 (1,57) [2,9-4,05]	8,9 (4,06) [6,35-12,15]	8,7 (3,96) [6,02-12,15]
ABL	>11	>11	>11	> 11	> 11
BFP	4,9 (2,21) [3,9-6,05]	>16,5	8,8 (4,04) [6,8-11,5]	16,69 (7,6) [12,33-22,6]	> 16,5
BFF	5,7 (2,6) [4,3-7,5]	8,0 (3,66) [5,9-11,0]	7,12 (3,25) [5,2-9,8]	14,1 (6,6) [10,5-20,0]	> 16,5
FF	3,2 (1,46) [2,6-3,9]	11,5 (5,27) [9,0-14,85]	7,3 (3,32) [6,2-8,5]	14,10 (6,4) [12,0-16,6]	> 16,5
FP	3,7 (1,71) [3,0-4,7]	5,6 (2,54) [5,0-6,3]	5,8 (2,65) [4,08-8,28]	13,40 (6,1) [10,6-17,0]	> 16,5

Legenda: AB (ácido betulínico puro), ABL (ácido betulínico em óleo de linhaça), FP (nanoemulsão FP com ácido betulínico), FF (nanoemulsão FF com ácido betulínico), BFP (branco da nanoemulsão FP) e BFF (branco da nanoemulsão FF).

Fonte: Elaborado pelo autor.

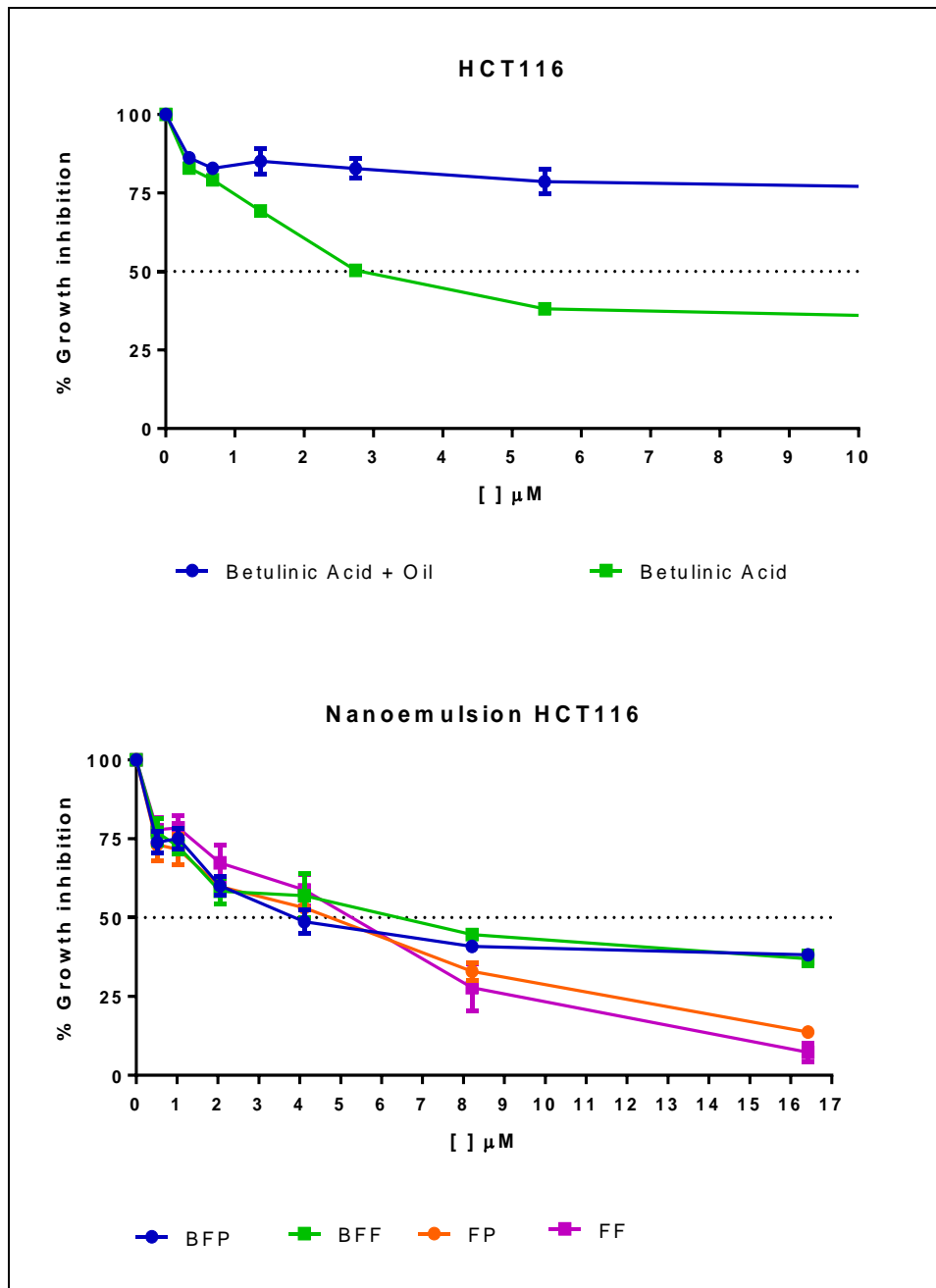
Os gráficos de % de Inibição *versus* concentração são mostrados na Figura 32 a 36:

Figura 32 – Gráficos de % de inibição de células L-929 *versus* concentração



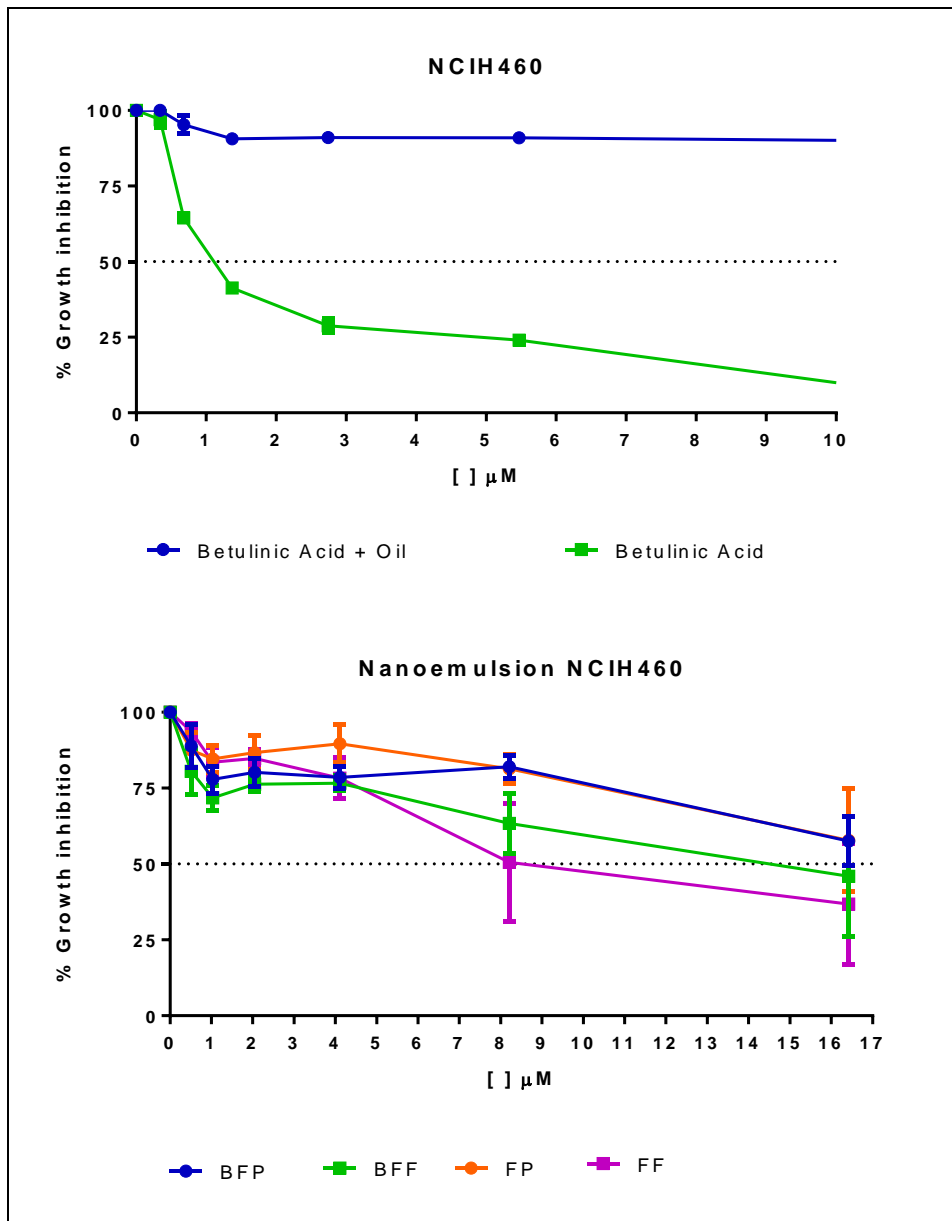
Fonte: Gerado pelo *GraphPad Prisma*

Figura 33 – Gráficos de % de inibição de células HCT-116 *versus* concentração



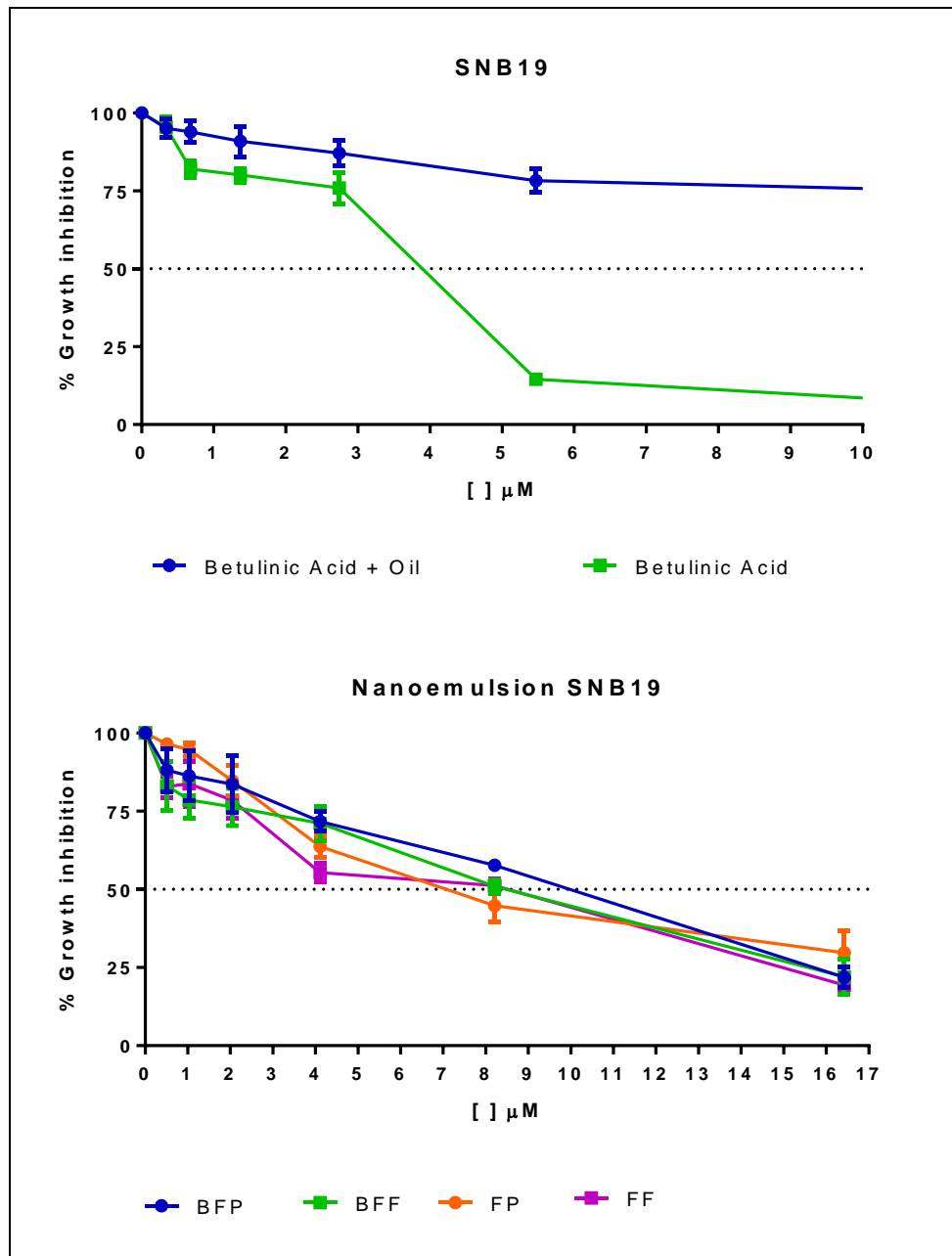
Fonte: Gerado pelo *GraphPad Prisma*

Figura 34 – Gráficos de % de inibição de células NCI-H460 *versus* concentração



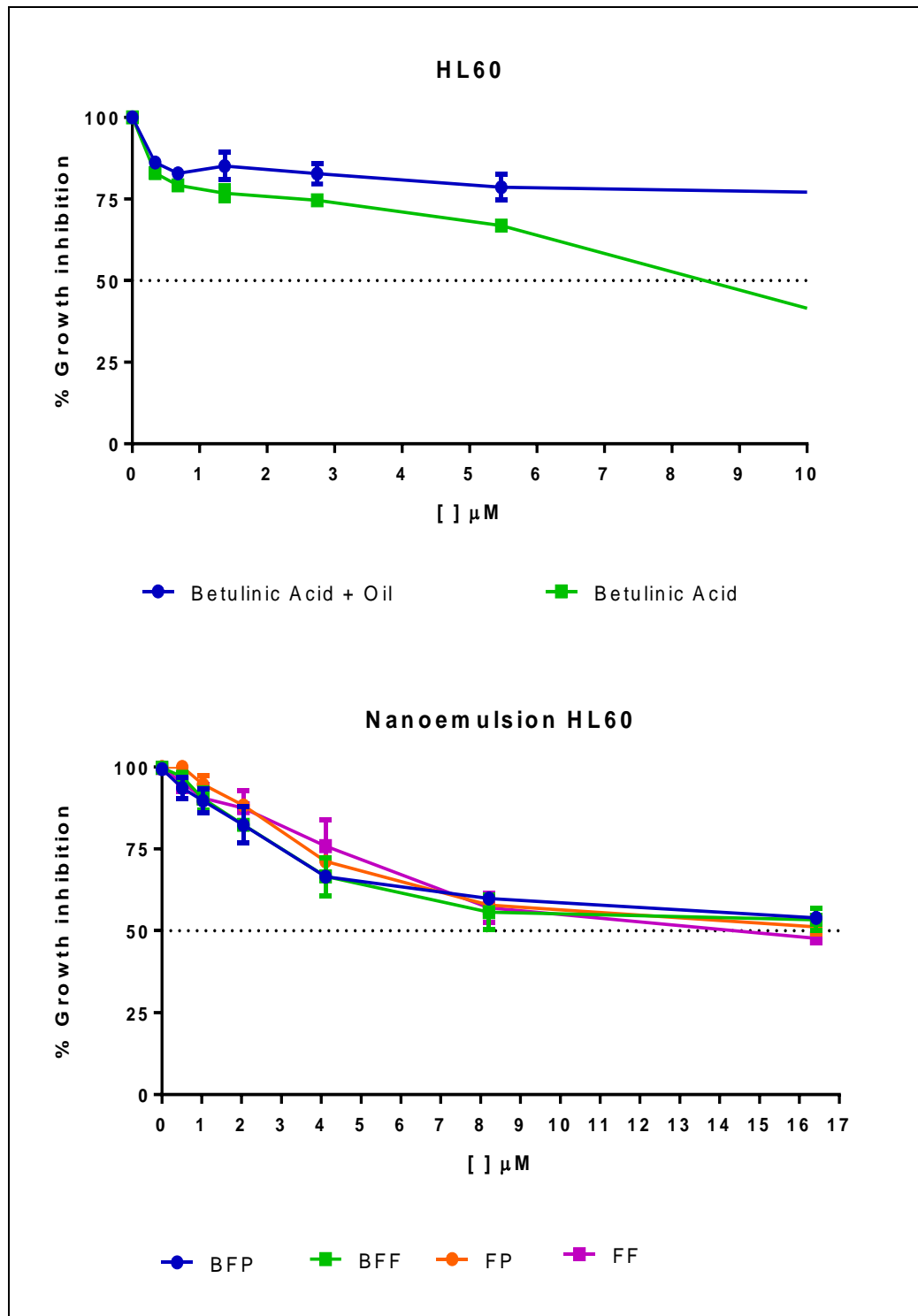
Fonte: Gerado pelo *GraphPad Prisma*

Figura 35 – Gráficos de % de inibição de células SNB-119 *versus* concentração



Fonte: Gerado pelo *GraphPad Prisma*

Figura 36 – Gráficos de % de inibição de células HL-60 *versus* concentração



Fonte: Gerado pelo *GraphPad Prisma*

Estudos conduzidos por Zhan et al. (2018) avaliando a atividade antiproliferativa em células H-460 (carcinoma pulmonar) resistente ao paclitaxel pelo ensaio MTT revelaram que o ácido betulínico exibiu IC_{50} de 50 μ M e que era dependente da concentração, no entanto esse valor foi encontrado para 48 h.

A diminuição do crescimento celular devido à ação do ácido betulínico também foi observada por células leucêmicas (U937, HL60 e k562) por Kumar et al (2010), exerceu 50% de inibição do crescimento (IC_{50}) nas concentrações de $13,73 \pm 0,89$, $12,84 \pm 1,23$, $15,27 \pm 1,16$ μ g/mL, respectivamente. No presente trabalho, a IC_{50} em HL-60 foi de apenas 6,9 μ g/mL (4,6 a 9,5), ou seja, efeito antiproliferativo melhor que o trabalho de Zhan.

O trabalho realizado por Wu et al. mostrou que o ácido betulínico foi citotóxico para células k562 com um IC_{50} de 21,26 μ g/mL em 24 h e após o tratamento em células k562 com 10 μ g/mL de AB para 72 h, o número de células foi reduzido em 58% IC_{50} muito maior do que encontrado por Kumar e colaboradores. Os ensaios realizados por Li et al (2010) com ácido betulínico apresentaram alta inibição do crescimento celular nas células HeLa, HepG2, A549 e MCF-7, com IC_{50} variando de 10 a 15 μ g/mL, mas em NCI-H460, PC-3 e SK-HEP-1 apresentaram atividade moderada com valores de IC_{50} variando de 20 a 60 μ g/mL e, em células k562, menor inibição do crescimento com $IC_{50} > 100$ μ g/mL. Este composto foi testado em linhagens de linfócitos canino (CL-1), linfoma canino de células B (CLBL-1) e Osteossarcoma canino (D-17), mostrando resultados significativos com diminuição da proliferação celular e tempo-dependente. A variação entre o IC_{50} encontrado nos trabalhos diferentes pode ser uma consequência do plaqueamento e do tempo do tratamento.

Na avaliação das nanoemulsões, observou-se que a formulação de FF mostrou IC_{50} menor que a formulação de BFF na linhagem NCI-H460, e pode-se afirmar que a formulação FF é mais citotóxica em relação ao seu branco para essas células tumorais. Ambos não tiveram nenhuma citotoxicidade frente a células não tumorais de fibroblastos.

A formulação do FP, quanto às HCT-116, apresentou potencial citotóxico semelhante ao ácido betulínico puro, maior em relação ao branco e similar à formulação de FF. Em contraste com as células NCI-H460, a formulação FP não mostrou citotóxico para as células SNB-19 e apresentou menor citotoxicidade em relação à formulação de FF. Em relação à ação citotóxica do branco das formulações pode estar relacionada a alguma atividade

antineoplásica de óleo de linhaça quando nanoemulsionado ou do óleo de linhaça quando associado ao Pluronic F127.

Ramzi et al. (2015) realizaram testes de atividade citotóxica de óleo de linhaça puro sobre células cancerosas pelo método MTT e verificaram que há atividade desse óleo, obtendo valores de IC_{50} frente células leucêmicas de $42,83 \text{ mg/mL} \pm 0,29$. Vishnu et al. (2018) também observaram atividade antineoplásica de óleo de linhaça contra células da linhagem KB (câncer da epiderme oral). Fukui et al. (2013) demonstraram que os ácidos ômega-3, predominantes na composição do óleo de linhaça, são capazes de causar acúmulo de espécies reativas de oxigênio mitocondrial em células cancerosas de mama humanas. O acúmulo dessas espécies, por sua vez, ativa a apoptose através de caspases, o que torna o óleo de linhaça um candidato promissor para estudos envolvendo atividade antineoplásica.

Observou-se que o ácido betulínico solubilizado no óleo não apresentou atividade citotóxica em todas as linhagens, ou seja, o óleo de linhaça e o ácido betulínico atuam apenas na forma nanoemulsionada. Em tumores multirresistentes a drogas, os poloxâmeros são capazes de atuar em células tumorais, aumentando sua permeabilidade a drogas antineoplásicas e podem induzir modificações em várias funções celulares, incluindo expressão gênica, respiração mitocondrial e síntese de ATP, aumentando a eficácia do tratamento (DEVI et al., 2013). Portanto, é possível que a ação esteja relacionada ao polímero ou ao pequeno tamanho das partículas oleosas.

Vale ressaltar, que um fator importante que pode influenciar na atividade citotóxica de formulações nanoestruturadas é o tamanho da partícula. Estudos realizados por Zheng et al (2014) verificaram a influência de sistemas de entrega de 5-DT (5-dimethyltangeretin) sobre o crescimento de células cancerosas HCT-116 com 24 h de tratamento e foi observado após o tratamento que emulsões contendo pequenas gotas de óleo (raio = 67 nm) apresentaram efeitos inibitórios de crescimento maiores nas células do que aqueles que contêm gotas maiores (raio = 203 nm).

Os melhores resultados obtidos a partir da atividade citotóxica das nanoemulsões foram para a linhagem HCT-116 (câncer colorretal) que tem valores semelhantes ao ácido betulínico puro. E formulações contendo ácido betulínico foram mais eficazes do que as formulações em branco para esta linhagem celular. Victor et al. (2017) apresentaram IC_{50} a 72

horas para o ácido betulínico puro de 1,73 µg/mL contra as células HCT-116, ou seja, semelhante ao obtido neste trabalho.

Para a linhagem SNB-19, os resultados confirmam a atividade citotóxica, porém com maior IC₅₀ em relação às demais linhagens. Não foi encontrado relato de testes de MTT de nanoemulsões de ácido betulínico na literatura frente às linhagens testadas neste trabalho, apenas para o ácido betulínico em nanotubos de carbono.

Anuchapreeda et al. (2012) testaram a atividade citotóxica de nanoemulsões contendo curcuminoides comparando com a atividade citotóxica de curcuminoides livres e demonstraram que a nanoemulsão carregada com curcumina teve um menor efeito de melanoma citotóxico em ratos e em células leucêmicas humanas, possivelmente devido à disponibilidade limitada de curcumina lenta e não completa liberação entre 24 e 72 horas. Este comportamento também foi observado com as formulações FF e FP contendo ácido betulínico.

Embora os resultados tenham mostrado atividade citotóxica de ácido betulínico puro maior ou similar, observou-se que as nanoemulsões FF e FP são mais vantajosas quando comparadas com o desempenho do ácido betulínico puro devido à presença de alta IC₅₀ no L929 (fibroblastos saudáveis células), enquanto todas as formulações de nanoemulsões testadas na mesma concentração não apresentaram.

Tan et al. (2014) demonstraram que os resultados de IC₅₀ do ácido betulínico em nanotubos de carbono sugerem a redução da citotoxicidade e os efeitos colaterais do ácido betulínico ativo puro.

O índice de seletividade consiste na razão entre as concentrações citotóxicas de 50% para as células não tumorais e a IC₅₀ das células tumorais. Esse índice indica o quanto uma substância é menos tóxica para células não tumorais do que às células tumorais, e essa proporção é considerada boa quando o índice é igual ou maior a 2. Esse valor é considerado significativo porque significa que o componente é duas vezes mais ativo contra a linhagem celular tumoral do que a linha celular normal (SUFFNESS; PEZZUTO, 1991), de acordo com os valores identificados na Tabela 16:

Tabela 16- Índice de seletividade das formulações testadas

Compostos	Índice de Seletividade (IS)			
	HCT-116	NCI H460	SNB 19	HL60
AB	2,54	2,53	0,98	2,54
ABL	-	-	-	-
BFP	>3,37	>1,88	>0,99	>3,37
BFF	>2,89	>2,32	>1,17	>2,89
FP	>4,46	>2,84	>1,23	>4,46
FF	>5,16	>2,26	>1,17	>5,16

Fonte: Elaborado pelo autor.

O ácido betulínico puro mostrou-se seletivo frente as linhagens testadas, exceto para a SNB-19.

A formulação FF se mostrou mais seletiva frente as células HCT-116 e HL-60 em relação a formulação FP. Porém todas formulações não se mostraram com boa seletividade frente células de SNB-19, este fato deve-se aos altos valores obtidos de IC₅₀ para esta linhagem.

5.11 Ensaio de dissolução

Os supositórios (Figura 38) preparados apresentaram peso médio de 3,25 e 3,23 g e 3900 µg/mL e 3870 µg/mL de ácido betulínico contendo as formulações FF e FP, respectivamente.

Figura 38 – Supositórios preparados com as nanoemulsões



Fonte: Autor

Para avaliar o perfil de dissolução de um medicamento é importante verificar e compreender o mecanismo pelo qual a droga é liberada do sistema matricial usado. A liberação de drogas de um sistema polimérico não é mais do que uma massa transferida de um

soluto do dispositivo para o meio (solvente) e vários fatores afetam este processo (a geometria do dispositivo, o meio de imersão, o tamanho do soluto, etc.) (VARMA et al., 2004).

Os modelos matemáticos utilizados neste estudo para melhor compreender os fenômenos de transporte que ocorreram para a dissolução do ácido betulínico (encapsulado e não encapsulado) da matriz gelatinosa foram os Ritger e Peppas (1987) e Higuchi pois são os mais adequados para matrizes que desintegram (LOPES; LOBO; COSTA, 2005).

O modelo proposto baseia-se na equação de Higuchi (1963), frequentemente utilizada para descrever a velocidade de liberação controlada do fármaco a partir de um sistema matricial.

A Equação 10 representa a equação de Higuchi expressa como fração de massa liberada (f):

$$f = K_H T^{0.5} \text{ (Equação 10)}$$

Onde K_H corresponde à constante de liberação de Higuchi, que reflete as características do desenho da formulação. Higuchi descreve o mecanismo de liberação dos fármacos como um processo de difusão (lei de Fick), estando dependente da raiz quadrada do tempo (T).

Outro modelo baseia-se na equação semi-empírica proposta por Ritger e Peppas (1987). Esta equação é utilizada para descrever a liberação do soluto quando o mecanismo que prevalece é uma combinação da difusão do fármaco (transporte Fickiano) e do transporte Caso II (não Fickiano, controlado pelo relaxamento das cadeias poliméricas) (RITGER; PEPPAS, 1987). Neste modelo, a relação entre a fração liberada (f) e o tempo é dada pela Equação 11:

$$f = K_p t^n \text{ (Equação 11)}$$

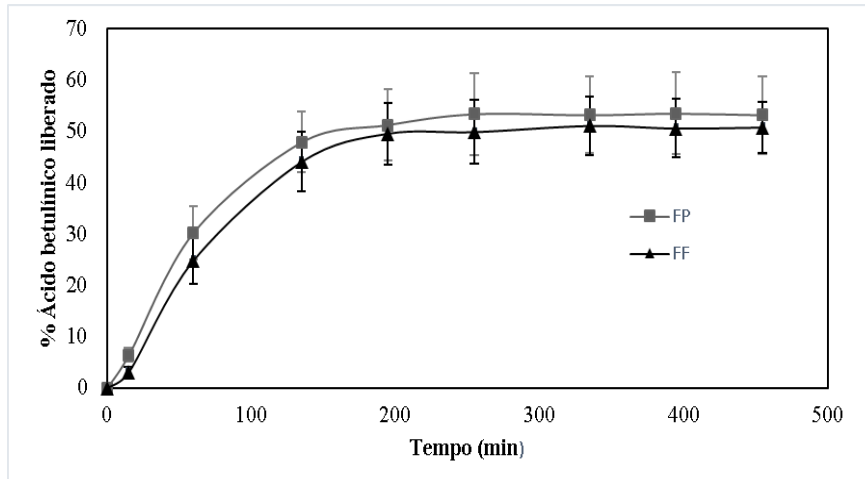
Onde K_p é uma constante cinética, que incorpora características estruturais e geométricas do mecanismo e n é o expoente de liberação que, de acordo com o valor numérico que assume, caracteriza o mecanismo de liberação do fármaco.

Com os dados obtidos de concentração e tempo, foram plotados os gráficos:

- % f versus tempo (Figura 39);
- Log % f versus log do tempo para testar o modelo de Ritger-Peppas (Figura 40);

- % f versus raiz quadrada do tempo para testar o modelo de Higuchi (Figura 41)

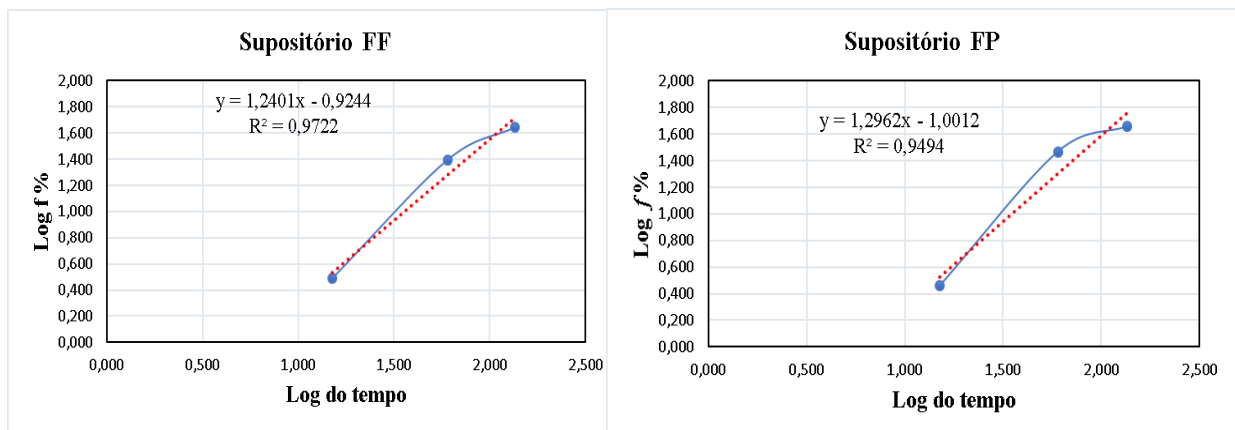
Figura 39 – Gráfico de % de ácido betulínico liberado versus tempo



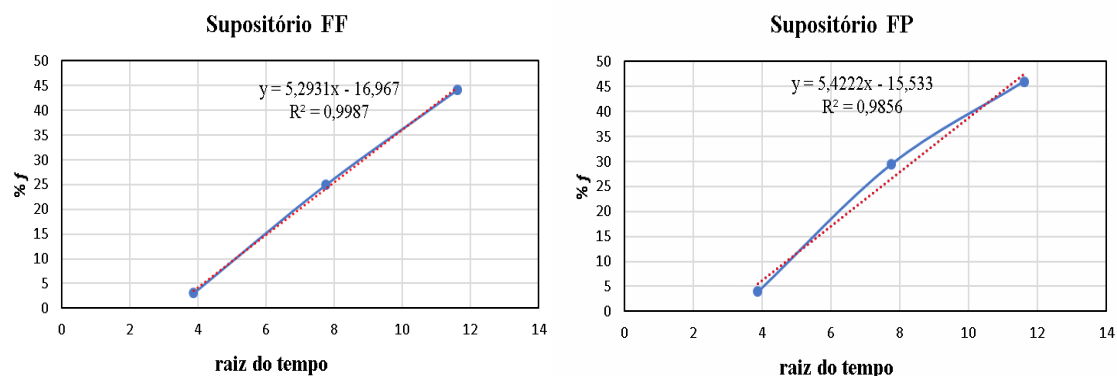
Fonte: Elaborado pelo autor.

A fração máxima liberada foi de aproximadamente 50,8% para a formulação FF e de 53,5% para a formulação FP, considerando os desvios padrões avaliados pela análise de variância ANOVA em um nível de confiança de 95% pode-se afirmar que não há diferença significativa entre esses valores.

Figura 40 – Gráfico do log f versus log do tempo



Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 41 – Gráfico de % f versus raiz quadrada do tempo

Fonte: Elaborado pelo autor.

A partir dos gráficos foram determinados os valores de R^2 de acordo com a Tabela 17:

Tabela 17 – Valores de R^2 obtidos dos modelos matemáticos de Higuchi e Ritger-Peppas

Formulação	R^2 Higuchi	R^2 Ritger-Peppas
FF	0,9987	0,9722
FP	0,9856	0,9494

Fonte: Elaborado pelo autor.

O modelo de Higuchi obteve o maior valor de R^2 sendo assim o modelo mais adequado para explicar a cinética de liberação. Este perfil cinético pode ser explicado pelo intumescimento da gelatina imersa no meio receptor (quando ocorre a difusão) e somente depois sofre erosão. Chioma e Yusuf (2018), também obtiveram um perfil cinético de liberação baseado no modelo de Higuchi a partir de supositórios de metaclopramida com gelatina na formulação. Apesar do modelo de Higuchi estar relacionado a difusão, sabe-se que em um ensaio de liberação geralmente existe mais de um mecanismo de liberação no qual um pode predominar, neste caso o mecanismo predominante é o de difusão devido ao intumescimento do supositório.

6 CONCLUSÃO

O resultado dessa pesquisa foram duas nanoemulsões FF e FP que apresentaram valores de potencial zeta, PDI, tamanho de partícula e pH favoráveis a estabilidade coloidal. Estes resultados foram confirmados no teste de estabilidade acelerada para as duas nanoemulsões.

Os resultados do estudo reológico mostraram valores semelhantes entre as nanoemulsões FF e FP com comportamento reológico e viscosidades adequadas para serem incorporadas a matrizes gelatinosas.

Quanto ao potencial citotóxico as formulações mostraram-se com potencial citotóxico significativo frente a células de HCT-116 (câncer colorretal) sendo mais vantajosas do que o ácido betulínico puro, pois as formulações não apresentaram potencial citotóxico frente a células de fibroblastos normais enquanto o ativo puro apresentou.

Os supositórios preparados a partir das nanoemulsões apresentaram perfil cinético de dissolução *in vitro* controlado por difusão.

A formulação FF (contendo somente Pluronic F127 como tensoativo), mostrou-se superior a formulação FP em estabilidade, morfologia e potencial citotóxico frente a células tumorais. Podendo-se considerar os supositórios formulados a partir destas nanoemulsões, promissores no tratamento de câncer colorretal.

REFERÊNCIAS

- ABNT, 07/2014. **Lista de Publicações**. Disponível em: <http://abnt.org.br/normalizacao/lista-de-publicacoes/abnt/category/3-2009>. Acesso em: 23 mar. 2019.
- ABUZARUR-ALOUL, R.; GJELLAN, K.; SJOLUND, M.; LOFQVIST, M.; GRAFFNER, C. Critical dissolution tests of oral systems based on statistically designed experiments. Screening of critical fluids and in vitro/in vivo modelling of extended release coated spheres. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, New York, v. 23, n. 8, p. 749-760, 1997.
- ADAMS, E., COOMANS, D., SMEYERS-VERBEKE, J., MASSART, D. L. Application of linear mixed effects models to the evaluation of dissolution profiles. **International journal of pharmaceutics.**, Amsterdam, v.226, p.107-125, 2001.
- AHMAD, K.; HO, C. C.; FONG, W. K.; TOJI, D. Properties of palm oil-in-water emulsions stabilized by nonionic emulsifiers. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 181, p. 595-604, 1996.
- ALI, MUAADH. A Review on Bi-layered Suppositories. **European Journal of Scientific Research**. 146. 45-54, 2017.
- ANUCHAPREEDA, S. et al. Preparation of lipid nanoemulsions incorporating curcumin for cancer therapy. **Journal of Nanotechnology**, v. 2012, 2012.
- AOCS. The Official Methods and Recommended Practices of the AOCS, 7th Edition. 2018.
- AUFLEM, I. H. **Influence of Asphalt Aggregation and Pressure on Crude Oil Emulsion**, Tese de doutorado, 2002.
- BARROSO, A. K. M. et al. Linhaça marrom e dourada Propriedades químicas e funcionais das sementes e dos óleos prensados a frio. **Ciência Rural**, v. 44, n. 1, p. 181– 187, 2014.
- BASTIDA-RODRÍGUEZ, J. The Food Additive Polyglycerol Polyricinoleate (E-476): Structure, Applications, and Production Methods. **ISRN Chemical Engineering**, v. 2013, p. 1–21, 2013.
- BAVISKAR, P.; BEDSE, A.; SADIQUE, S.; KUNDE, V.; JAISWAL, S. Drug delivery on rectal absorption: Suppositories. **International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research**. 21. 70-76, 2013.
- BRASIL ABNT. **Determinação da massa específica e da densidade relativa pelo densímetro digital**. NBR14065, 05/2013.
- BRASIL ABNT. **Determinação de viscosidade de líquidos transparentes e opacos**. NBR10.441.

BRASIL ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução da Diretoria Colegiada - RDC Nº 166, 24/07/2017. **Guia para validação de métodos analíticos** - Julho, 2017.

BRASIL ANVISA. **Guia para Estabilidade de Produtos Farmacêuticos**. CP n453 de 28 de dezembro de 2017.

BRASIL ANVISA. **Regulamento técnico para óleos vegetais, gorduras vegetais e creme vegetal**. Anexo da RDC No. 270, DE 22 DE SETEMBRO DE 2005, 12/2005.

BRASIL INMETRO. **Orientação sobre validação de métodos analíticos**. DOC- CGCRE-008, n. 07, 07/2018.

BRUXEL, F.; LAUX, M.; FRAGA, M.; KOESTER, L. S.; TEIXEIRA, H. Nanoemulsões como sistemas de liberação parenteral de fármacos. **Química Nova**, São Paulo, v. 35, n. 9, p. 1827-1840, 2012.

BUTT, H.; VOLLMER, D.; AUERNHAMMER, G. Surface and Interfacial Forces - From Fundamentals to Applications. **Progress in Colloid and Polymer Science**, Vol. 134, p. 129, 2008.

CANTANHEDE FILHO, A.J., SANTOS, L.S., GUILHON, G. M. S. P., ZOGHBI, M.G.B., PORTS, P., RODRIGUES, I.C.S. Triterpenoides, fenólicos e efeito fitotóxico das folhas de *Eugenia flavescens* DC (Myrtaceae). **Química Nova**, 40(3), p. 252-259, 2017.

CARPENTER, J.; SAHARAN, V. K. Ultrasonic assisted formation and stability of mustard oil in water nanoemulsion: Effect of process parameters and their optimization. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 35, p. 422–430, 2017.

CASTAGNARO, D.; GADOTTI, G.; CANABARRO, I.M.; TAGLIARI, I.M. Estabilidade físico-química de formulações para nutrição parenteral neonatal manipuladas em hospital universitário. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 34, n. 2, p. 275–280, 2013.

CAVAZOS GARDUÑO, A.; OCHOA, F.A.; SERRANO-NIÑO, J.C.; BERISTAIN, C.I.; GARCIA, H. Operating and Compositional Variables for Preparation of Betulinic Acid Nanoemulsions. **Revista Mexicana de Ingeniería Química**, v. 13, n. 3, p. 689–703, 2014.

CEKIC, N.; DORDEVIC, S.M.; SAVIC, S.R.; SAVIC, S.D.. A full factorial design in the formulation of diazepam parenteral nanoemulsions: Physicochemical characterization and stability evaluation. **Advanced technologies**, v. 4, n. 1, p. 69–77, 2015.

CHANG, H.M.; MOUDGIL, R.; SCARABELLI, T.; OKWUOSA, T.M.; YEH, E.T.H. Cardiovascular Complications of Cancer Therapy. **Journal of the American College of Cardiology**, v. 70, n. 20, p. 2536–2551, 2017.

CHAUHAN, R., CHESTER, K., KHAN, Y., TAMBOLI, E. T., AHMAD, S. Characterization of *Linum usitatissimum* L. oil obtained from different extraction technique and in vitro

antioxidant potential of supercritical fluid extract. **Journal of pharmacy & bioallied sciences**, 7(4), 284–288, 2015.

CHIOMA, E; YUSUF, D.F. Formulation and evaluation of metoclopramide hcl rectal suppositories. **Universal Journal of Pharmaceutical Research**; Vol. 3, Issue 6, p. 12-16, 2018.

CHOONARA, I A. Giving drugs per rectum for systemic effect. **Archives of disease in childhood** vol. 62,8: 771-2, 1987.

COELHO, E. D. L.; MOURA, C. L. D.; MAIA, D. D. S.; ARAÚJO, T. G. D.; DE FRANÇA, F.C.; RICARDO, N. M.P.S.; RIBEIRO, M. E. N. P.; RICARDO, N. M. P. S. Binary systems of Brij® surfactants with Pluronic® F127 as griseofulvin carrier. **Química Nova**, Brasil, v. 40, n. 3, p. 305-309, 2017.

CSUK, R. Betulinic acid and its derivatives: a patent review (2008 – 2013). **Expert Opinion on Therapeutic Patents**, v. 24, n. 8, p. 913–923, 2014.

DAI, L.; LI, D.; CHENG, J.; LIU, J.; DENG, L.H.; WANG, L.Y.; LEI, J.D.; HE, J. Water soluble multiarm-polyethylene glycol-betulinic acid prodrugs: Design, synthesis, and in vivo effectiveness. **Polymer Chemistry**, v. 5, n. 19, p. 5775–5783, 2014.

DAVIS, H. T.. Factors determining emulsion type: Hydrophile—lipophile balance and beyond. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, 91, p. 9–24, 1994.

DEHELEAN, C. A.; FEFLEA, S.; GANTA, S.; AMIJI, M. Anti-angiogenic effects of betulinic acid administered in nanoemulsion formulation using chorioallantoic membrane assay. **Journal of Biomedical Nanotechnology**, v. 7, n. 2, p. 317–324, 2011.

DEVI, D. RAMYA; SANDHYA, P.; HARI, B. N. VEDHA. Poloxamer: A Novel Functional Molecule For Drug Delivery And Gene Therapy. **Journal of Pharmaceutical Sciences & Research**; Vol. 5 Issue 8, p159, 2013.

FREDRICK, E., P. WALSTRA, K. DEWETTINCK. Factors governing partial coalescence in oil-in-water emulsions. **Advanced Colloid Interface Sciences**. 153: p.30–42, 2010.

FRIEDEL, H.D., BROWN, C.K., BARKER, A.R., BUHSE, L.F., KEITEL, S., KRAEMER, J., MORRIS, J.M., REPPAS, C., SPERRY, D.C., SAKAI-KATO, K., STICKELMEYER, M.P., & SHAH, V.P. FIP Guidelines for Dissolution Testing of Solid Oral Products. **Journal of pharmaceutical sciences**, 107 12, p. 2995-3002, 2018.

FUKUI, M.; KANG, K.J.; OKADA, K.; ZHU, B.T. EPA, an omega-3 fatty acid, induces apoptosis in human pancreatic cancer cells: Role of ROS accumulation, caspase-8 activation, and autophagy induction. **Journal of Cellular Biochemistry**, v. 114, n. 1, p. 192–203, 2013.

FULDA, S. Betulinic acid for cancer treatment and prevention. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 9, n. 6, p. 1096–1107, 2008.

GEBAUER, S. K.; PSOTA T.L., HARRIS, W.S., KRIS-ETHERTON, P.M. n-3 fatty acid dietary recommendations and food sources to achieve essentiality and cardiovascular benefits. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 83, p. 1526S-1535S, 2006.

GIOFFREDI, E.; BOFFITO, M.; CALZONE, S.; GIANNITELLI, M.; RAINER, A.; TROMBETTA, M.; MOZETIC, P.; CHIONO, V. Pluronic F127 Hydrogel Characterization and Biofabrication in Cellularized Constructs for Tissue Engineering Applications. **Procedia CIRP**, v. 49, n. iii, p. 125–132, 2016.

GUAN, Y.; HUANG, J.; ZUO, L.; XU, J.; SI, L.; QIU, J.; LI, G. Effect of pluronic P123 and F127 block copolymer on P-glycoprotein transport and CYP3A metabolism. **Archives of Pharmacal Research**, v. 34, n. 10, p. 1719–1728, 2011.

HAM, A.; BUCKHEIT, R.J. Designing and developing suppository formulations for anti-HIV drug delivery. **Therapeutic Delivery**. 8. 805-817, 2017.

HARWANSH, R. K., MUKHERJEE, P. K., BISWAS, S. Nanoemulsion as a novel carrier system for improvement of betulinic acid oral bioavailability and hepatoprotective activity. **Journal of Molecular Liquids**, 237, 361–371, 2017.

HIGUCHI, T. Mechanism of sustained-action medication. Theoretical analysis of rate of release of solid drugs dispersed in solid matrices. **Journal of Pharmaceutical Sciences**. New York, v. 52, p. 1145-1149, 1963.

HO, C. C.; AHMAD, K. Electrokinetic behavior of palm oil emulsions in dilute electrolyte solutions. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 216, p. 25-33, 1999.

HONARY, S.; ZAHIR, F. Effect of zeta potential on the properties of nano-drug delivery systems - A review (Part 1). **Tropical Journal of Pharmaceutical Research**, v. 12, n. 2, p. 255–264, 2013.

HOSMER JM, STEINER AA, LOPES LB. Lamellar liquid crystalline phases for cutaneous delivery of Paclitaxel: impact of the monoglyceride. **Pharmaceutical Research** 30:694–706, 2013.

HSU, J. P.; NACU, A. Behavior of soybean oil-in-water emulsion stabilized by nonionic surfactant. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 259, p. 374-81, 2003.

HUSSEIN, S.; ARULSELVAN, P.; FAKURAZI, S.; HUSSEIN, M. The in vitro therapeutic activity of betulinic acid nanocomposite on breast cancer cells (MCF-7) and normal fibroblast cell (3T3). **Journal of Materials Science**. 49, 2014.

INCA. Disponível em <https://www.inca.gov.br/>, Acesso em 29/03/2019.

JAGDALE, S.; SWATI, C.; KAMBLE, B.; BHANUDAS, S. K.; ANIRUDDHA, R. Design and evaluation of polyox and pluronic controlled gastroretentive delivery of troxipide. **Journal of drug delivery**, v. 2014, p. 804616, 2014.

- JÄGER, S., WINKLER, K., PFÜLLER, U., SCHEFFLER, A. Solubility studies of oleanolic acid and betulinic acid in aqueous solutions and plant extracts of *Viscum album L.* **Planta Medica**, v. 73, n. 2, p. 157–162, 2007.
- JAIN, J.; FERNANDES, C.; PATRAVALE, V. Formulation Development of Parenteral Phospholipid-based Microemulsion of Etoposide. **AAPS PharmSciTech**, v. 11, n. 2, p. 826–831, 2010.
- JAISWAL, M.; DUDHE, R.; SHARMA, P. K. Nanoemulsion: an advanced mode of drug delivery system. **3 Biotech**, v. 5, n. 2, p. 123–127, 2015.
- JUITA, B.; DLUGOGORSKI, Z.; KENNEDY, E.; MACKIE, J. C. Low temperature oxidation of linseed oil: a review. **Fire Science Reviews**, v. 1, n. 1, p. 3, 2012.
- KAITHWAS, G.; MAJUMDAR, D. K. Effect of *L. usitatissimum* (Flaxseed/Linseed) Fixed Oil against Distinct Phases of Inflammation. **Inflammation**, v. 2013, p. 1–4, 2013.
- KARAKULAK, U. N. et al. Capecitabine-induced coronary artery vasospasm in a patient who previously experienced a similar episode with fluorouracil therapy. **Turk Kardiyoloji Dernegi Arsivi**, v. 44, n. 1, p. 71–74, 2016.
- KELA, K, KAUR, D.R. Pharmaceutical nanoemulsions an ardent carrier for drug delivery. **Indo American Journal of Pharmaceutical Research**. 3. p. 9202-9212, 2013.
- KHAN, I., BAHUGUNA, A., KUMAR, P., BAJPAI, V., KANG, S.C. In vitro and in vivo antitumor potential of carvacrol nanoemulsion against human lung adenocarcinoma A549 cells via mitochondrial mediated apoptosis. **Scientific Reports**, 144,8,1, p. 2045-2322, 2018.
- KIM, T.; LEE, C. H.; JOO, S. W.; LEE, K. Kinetics of gold nanoparticle aggregation: experiments and modelling. **Journal of Colloid and Interface Science**, [s.l.], v. 318, n. 2, p. 238-243, 2008.
- KUIPERS, E. J.; GRADY, W. M.; LIEBERMAN, D.; SEUFFERLEIN, T.; SUNG, J. J.; BOELEN, P. G.; CORNELIS, J. H.; WATANABE, V. V. Colorectal cancer. **Nature Reviews Disease Primers** volume 1, Article number: 15065, 2015.
- KUMAR, D., MALLICK, S., VEDASIROMONI, J. R., PAL, B. C. Anti-leukemic activity of *Dillenia indica L.* fruit extract and quantification of betulinic acid by HPLC. **Phytomedicine**, 17(6), 431–435, 2010.
- KUMAR, P., SINGH, A. K., RAJ, V., RAI, A., KESHARI, A. K., KUMAR, D., ... SAHA, S. Poly(lactic-co-glycolic acid)-loaded nanoparticles of betulinic acid for improved treatment of hepatic cancer: characterization, in vitro and in vivo evaluations. **International journal of nanomedicine**, 13, 975–990, 2018.
- LAMATTINA, J. C., GOLAN, D. E. Farmacocinética. Em G. Koogan (Ed.), **Princípios de farmacologia - A base fisiopatológica da farmacoterapia** (2a Edição., pp. 28–45). Rio de Janeiro, Brasil, 2009.

- LASZCZYK, M. N. Pentacyclic triterpenes of the lupane, oleanane and ursane group as tools in cancer therapy. **Planta Medica**, v. 75, n. 15, p. 1549–1560, 2009.
- LEE, J. J.; CHU, E. Adherence, Dosing, and Managing Toxicities With Trifluridine/Tipiracil (TAS-102). **Clinical Colorectal Cancer**, 16(2), p. 85–92, 2017.
- LEWINSKA, A.; ZEBROWSKI, J.; DUDA, M.; GORKA, A.; WNUK, M. Fatty acid profile and biological activities of linseed and rapeseed oils. **Molecules**, v. 20, n. 12, p. 22872–22880, 2015.
- LI, Y., HE, K., HUANG, Y., ZHENG, D., GAO, C., CUI, L., JIN, Y.H. Betulin induces mitochondrial cytochrome c release associated apoptosis in human cancer cells. **Molecular Carcinogenesis**, 630-640, 2010.
- LIEBERMAN, H. A.; RIEGER, M. M.; BANKER, G. S. **Pharmaceutical dosage forms: disperse systems**. New York: Marcel Dekker, v. 1, 1988.
- LIN, Y.; HE, X.; ZHOU, D.; LI, L.; SUN, J.; JIANG, X. Co-delivery of doxorubicin and itraconazole by Pluronic® P123 coated liposomes to enhance the anticancer effect in breast cancers. **RSC Advances**, v. 8, n. 42, p. 23768–23779, 2018.
- LIU, L.; YONG, K.; ROY, I.; LAW, W.; YE, L.; LIU, J.; KUMAR, R.; ZHANG, X.; PRASAD, P. Bioconjugated pluronic triblock-copolymer micelle-encapsulated quantum dots for targeted imaging of cancer: In vitro and in vivo studies. **Theranostics**, v. 2, n. 7, p. 705–713, 2012.
- LIU, SHENGQUAN; SZE, N. H. LO. Design of low-molecular-weight prodrugs for targeted delivery of anticancer agents. **Pharmaceutics & Novel Drug Delivery Systems**, v. 7, n. February, p. 2012, 2012.
- LOPES, C. M.; LOBO, J. M. S.; COSTA, P. Formas farmacêuticas de liberação modificada: polímeros hidrofílicos. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, São Paulo, v. 41, n. 2, p. 143-154, June 2005.
- MAGENHEIM, B.; BENITA, S. Nanoparticle characterization: a comprehensive physicochemical approach. **S.T.P. pharma sciences**, v. 1, p. 221-241, 1991.
- MANADAS, R.; PINA, M. E.; VEIGA, F. A dissolução in vitro na previsão da absorção oral de fármacos em formas farmacêuticas de liberação modificada. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, São Paulo, v. 38, n. 4, p. 375-399, Dec. 2002.
- McCLEMENTS, D. J. Critical review of techniques and methodologies for characterization of emulsion stability. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 47, n. 7, p. 611–649, 2007.
- MILINSK, M.C.; MAKOTO, M.; VISENTAINER, J.V.; DIAS, L.F.; YAMAGUCHI, M.M.; PEDRÃO, M.R.; SOUZA, M.E. Influência do método de esterificação na quantificação de ácidos graxos em óleo de oliva. **Semina: Ciências Exatas e Tecnológicas**, v. 32, n. 2, p. 139–150, 2011.

MORTENSEN, A.; AGUILAR, F.; CREBELLI, R.; DOMENICO, A.; DUSEMUND, B.; FRUTOS, M. J. Reevaluation of polyglycerol polyricinoleate (E 476) as a food additive. **European Food Safety Authority**, v. 15, n. 3, 2017.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of Immunological Methods**, v. 65, n. 1–2, p. 55–63, 1983.

MOTA, L. A. B.; SOUZA, D. P. F. filmes cerâmicos NiO-YSZ Effect of slurry variables formulation on the rheological behavior and microstructure of NiO-YSZ ceramic film. **Revista Matéria**, v. 12, p. 383–393, 2007.

MUELLER, K.; EISNER, P.; YOSHIE-STARK, Y.; NAKADA, R.; KIRCHOFF, E.; Functional properties and chemical composition of fractionated brown and yellow linseed meal (*Linum usitatissimum* L.). **Journal of Food Engineering**, 98: p.453–460, 2010.

MULLAUER, F.B., BLOOIS, L., DAALHUISEN, J.B., TEN, B.M.S., STORM, G., MEDEMA, J.P., SCHIFFELERS, R.M., KESSLER, J.H. Betulinic acid delivered in liposomes reduces growth of human lung and colon cancers in mice without causing systemic toxicity. **Anti-Cancer Drugs**, v. 22, n. 3, p. 223–233, 2011.

MYERS, D. **Surfaces, Interfaces, and Colloids: Principles and Applications**. 2nd Edition, USA, John Wiley and Sons Inc., 1999.

OFOEFULE, S. I., OKOLI, S. E., CHUKWU, A. Mechanisms behind sustained release matrix tablets prepared with poly(acrylic) acid polymers. **Acta Pharmaceutica**, v. 50, n. 3, p. 229–238, 2000.

ONCOGUIA. Tratamentos para o câncer. Disponível em: <http://www.oncoguia.org.br/conteudo/tratamentos/77/50/>. Acesso em: 21 out. 2018.

ORAFIDIYA, L.O.; OLADIMEJI, F.A. Determination of the required HLB values of some essential oils. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 237, p. 241–249, 2002.

PAI, S.; UPADHYA, V.; HEGDE, H.; JOSHI, R. K.; KHOLKUTE, S. New Report of Triterpenoid Betulinic Acid along with Oleanolic Acid from *Achyranthes aspera* by Reversed-Phase-Ultra Flow Liquid Chromatographic Analysis and Confirmation Using High-Performance Thin-Layer Chromatographic and Fourier Transform-Infrared Spectroscopic Techniques. **JPC - Journal of Planar Chromatography - Modern TLC**. 27. 38-41, 2014.

PAL, R.; YAN, Y.; MASLIYAH, J. Rheology of emulsions. Tradução: Schramm, L. L. Emulsions: Fundamentals and applications in the petroleum industry. **Washington: Advances in Chemistry Series**, 79-129 p., 1992.

PEREIRA, G. G., DIMER, F. A., GUTERRES, S. S., KECHINSKI, C. P., GRANADA, J. E., CARDOZO, N. S. M. Formulation and characterization of poloxamer 407®: thermoreversible

gel containing polymeric microparticles and hyaluronic acid. **Química Nova**, 36(8), 1121-1125, 2013.

PISHA, E., CHAI, H., LEE, S. I., CHAGWEDERA, T. E., FARNSWORTH, N. R., CORDELL, G. A., BEECHER, C. W. W., FONG, H. H. S., KINGHORN, A. D., BROWN, D. M., WANI, M. C., WALL, M. E., HIEKEN, T. J., DAS GUPTA, T. K. & PEZZUTO, J. M. Discovery of betulinic acid as a selective inhibitor of human melanoma that functions by induction of apoptosis, **Nature Medicine**, 1: 1046–1051, 1995.

POKORNY, R.M., WRIGHTSON, W.R., LEWIS, R.K., PARIS, K.J., HOFMEISTER, A., LAROCCA, R., MYERS, S.R., ACKERMAN, D., GALANDIUK, S. Suppository administration of chemotherapeutic drugs with concomitant radiation for rectal cancer. **Diseases of the Colon and Rectum**, v. 40, n. 12, p. 1414–1420, 1997.

POON, K.H., ZHANG, J., WANG, C., TSE, A.K., WAN, C.K., FONG, W.F. Betulinic acid enhances 1 α , 25-dihydroxyvitamin D₃-induced differentiation in human HL-60 promyelocytic leukemia cells. **Anticancer Drugs**, 15(6): p. 619-24, 2004.

POPA, V.M., GRUIA, A., DUMBRAVA, D., MOLDOVAN, C., BORDEAN, D., CONSTANTIN, M. Journal of Agroalimentary **Processes and Technologies** v. 18, n. 2, p. 136–140, 2012.

PRADHAN, R. C.; VENKATESH, M. B., PRASANT, K. R. A , SATYANARAYAN, N. A., AJAY, K. D. Supercritical CO₂ extraction of fatty oil from flaxseed and comparison with screw press expression and solvent extraction processes. **Journal of Food Engineering**, v. 98, n. 4, p. 393–397, 2010.

PUROHIT, T. J.; HANNING, S. M.; WU, Z. Advances in rectal drug delivery systems. **Pharmaceutical Development and Technology**, v. 23, n. 10, p. 942–952, 2018.

RAHN-CHIQUÉ, K.; BARRIENTOS, O.; URBINA-VILLALBA, G. Nanoemulsion stability above the critical micelle concentration: a contest between solubilization, flocculation and kraft precipitation. **Revista del Centro de Estudios Interdisciplinarios de la Física** v. 6, 2017.

RAMZI, G. A.; PUNEETH, H. R.; MADHU, C. S.; SHARADA, A. C. Antagonistic effects of combination of flaxseed oil and spirulina platensis oil on their biological properties. **International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**, v. 7, p. 122–127, 2015.

RITGER, P.; PEPPAS, N.A. A simple equation for description of solute release. II. Fickian and anomalous release from swellable devices. **Journal of Controlled Release**, Amsterdam, v. 5, n. 1, p. 37-42, 1987.

RODRIGUES, I.; RAMOS, A.; FALCÃO, D.; FERREIRA, J.; BASSO, S.; ROCHA, A. S. J., AMARAL, A. C. F. Development of nanoemulsions to enhance the antileishmanial activity of copaifera paupera oleoresins. **BioMed Research International**, v. 2018, 2018.

SARTORIUS. **Manual tubo ultracentrifugação Vivaspin**. UK, 2016.

SERRA, C.H.; STORPIRTIS, S. Comparação de perfis de dissolução da cefalexina através de estudos de cinética e eficiência de dissolução (ED%). **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, São Paulo, v. 43, n. 1, p. 79-88, Mar. 2007.

SHARMA N, BANSAL M, VISHT S, SHARMA P K, KULKARNI G T. Nanoemulsion: A new concept of delivery system. **Chron Young Sci**, ;1:2-6; 2010.

SIEWERT, M.; DRESSMAN, J.; BROWN, C.K.; SHAH, V.P. FIP/AAPS guidelines to dissolution/in vitro release testing of novel/special dosage forms. **AAPS PharmSciTech**, v.4, p.1-10, 2003.

SINGH, Y.; MEHER, J.; RAVAL, K.; CHAURASIA, M.; JAIN, N.; CHOURASIA, M. Nanoemulsion: Concepts, development and applications in drug delivery. **Journal of Controlled Release**, v. 252, p. 28–49, 2017.

SIOKA, C.; KYRITSIS, A. P. Central and peripheral nervous system toxicity of common chemotherapeutic agents. **Cancer Chemotherapy and Pharmacology**, 63(5), 761–767, 2009.

SOICA, C., DANCIU, C.; GERMAINE, S., FLORIN, B., AMBRUS, R.; ZUPKO,³ FLORINA BOJIN, I.; CORICOVAC, D. Betulinic acid in complex with a gamma-cyclodextrin derivative decreases proliferation and in vivo tumor development of non-metastatic and metastatic B16A5 cells. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 15, n. 5, p. 8235–8255, 2014.

SUFFNESS, M., PEZZUTO, J.M. Assays for Bioactivity. In *Methods in Plant Biochemistry*. K. Hostettmann (Editor). **London Academic Press**; p. 71-133, 1991.

SUGUMAR, S.; MUKHERJEE, A.; CHANDRASEKARAN, N. Eucalyptus oil nanoemulsion-impregnated chitosan film: Antibacterial effects against a clinical pathogen, *Staphylococcus aureus*, in vitro. **International Journal of Nanomedicine**, v. 10, p. 67–75, 2015.

TADROS, T., IZQUIERDO, P., ESQUENA, J., SOLANS, C. Formation and stability of nano-emulsions. **Advances in Colloid and Interface Science**, v. 108–109, p. 303–318, 2004.

TAN, J.M., KARTHIVASHAN, G., ARULSELVAN, P., FAKURAZI, S., HUSSEIN, M. Z. Characterization and in vitro studies of the anticancer effect of oxidized carbon nanotubes functionalized with betulinic acid. *Drug Design, Development and Therapy*, v. 8, p. 2333–2343, 2014.

TANSKA, M, ROSZKOWSKA, B., SKRAJDA, M., DĄBROWSKI, G. Commercial Cold Pressed Flaxseed Oils Quality and Oxidative Stability at the Beginning and the End of Their Shelf Life. **J Oleo Sci**, v. 65, n. 2, p. 111– 121, 2016.

TEO, S. Y.; LEE, S.; LIN, O. H.; LIN, O. C.; GAN, S. N.; RATHBONE, M.; COOMBES, A. Evaluation of Biosourced Alkyd Nanoemulsions as Drug Carriers. **Journal of Nanomaterials**, v. 2015, 2015.

TINGSTAD, J. E. Dissolution rate testing for the optimization of formulations. **Pharmaceutical Industry**, Aulendorf, v. 40, n.7, p. 751-757, 1978.

URSICA, L.; TITA, D.; PALICI, I.; TITA, B.; VLAIA, V. Particle size analysis of some water/oil/water multiple emulsions. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, [s.l.], v. 37, n. 5, p. 931-936, 2005.

USP **United States Pharmacopeia and National Convention USP 35-NF 30**. Rockville MD, EUA, 2012.

VARMA, P., AGRAWAL, S., ASHOKRAJ, Y., BHARATAM & PANCHAGNULA, R. Solid-state characterization of rifampicin samples and its biopharmaceutic relevance. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, 22(2-3), 127-144, 2004.

WU, Q., JING, H., JUN, F., & MEI, H. (2010). Antitumor effect of betulinic acid on human acute leukemia K562 cells in vitro. **Journal of Huazhong University of Science and Technology [Medical Sciences]**, 30(4), 453-457, 2010.

YU, S. et al. Nanostructured lipid carrier (NLC)-based novel hydrogels as potential carriers for nepafenac applied after cataract surgery for the treatment of inflammation: design, characterization and in vitro cellular inhibition and uptake studies. **RSC Advances**, v. 7, n. 27, p. 16668-16677, 2017.

ZHAN, X. K. et al. Betulinic acid exerts potent antitumor effects on paclitaxel-resistant human lung carcinoma cells (H460) via G2/M phase cell cycle arrest and induction of mitochondrial apoptosis. **Oncology Letters**, v. 16, n. 3, p. 3628-3634, 2018.

ZHANG, M.; YANG, B.; LIU, W.; LI, S. Influence of hydroxypropyl methylcellulose, methylcellulose, gelatin, poloxamer 407 and poloxamer 188 on the formation and stability of soybean oil-in-water emulsions. **Asian Journal of Pharmaceutical Sciences**, China, v. 12, p. 521-531, 2017.

ZHANG, Z. S. et al. Characteristics of flaxseed oil from two different flax plants. **International Journal of Food Properties**, v. 14, n. 6, p. 1286-1296, 2011.

ZHENG, J., LI, Y., SONG, M., FANG, X., CAO, Y., MCCLEMENTS, D. J., & XIAO, H. Improving intracellular uptake of 5-demethyltangeretin by food grade nanoemulsions. **Food Research International**, 62, 98-103, 2014