

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS
FARMACÊUTICAS**

**DESENVOLVIMENTO DE NANOEMULSÕES DE
ÓLEO DE ROMÃ CONTENDO OU NÃO
CETOPROFENO: AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE
ANTITUMORAL E ANTINOCICEPTIVA**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Luana Mota Ferreira

**Santa Maria, RS, Brasil
2014**

DESENVOLVIMENTO DE NANOEMULSÕES DE ÓLEO DE ROMÃ CONTENDO OU NÃO CETOPROFENO: AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTITUMORAL E ANTINOCICEPTIVA

Luana Mota Ferreira

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Área de Concentração em Controle e Avaliação de Insumos e Produtos Farmacêuticos, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Ciências Farmacêuticas**

Orientadora: Profa. Dra. Letícia Cruz

**Santa Maria, RS, Brasil
2014**

**Universidade Federal de Santa Maria
Centro de Ciências da Saúde
Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas**

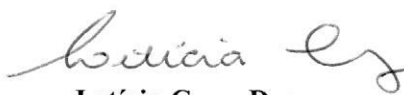
A Comissão Examinadora, abaixo assinada,
aprova a Dissertação de Mestrado

**DESENVOLVIMENTO DE NANOEMULSÕES DE ÓLEO DE ROMÃ
CONTENDO OU NÃO CETOPROFENO: AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE
ANTITUMORAL E ANTINOCICEPTIVA**

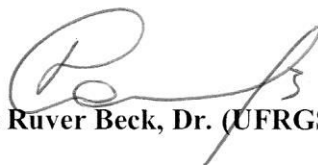
elaborada por
Luana Mota Ferreira

como requisito parcial para obtenção do grau de
Mestre em Ciências Farmacêuticas

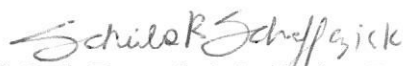
COMISSÃO EXAMINADORA:



Leticia Cruz, Dra.
(Presidente/Orientadora)



Ruy Carlos Rüver Beck, Dr. (UFRGS)



Scheila Rezende Schaffazick, Dra. (UFSM)

Santa Maria, 03 de outubro de 2014.

Dedico esta dissertação à minha mãe Mara e à minha avó Regina.

“Ó meu Pai do céu, limpe tudo aí. Vai chegar a rainha, precisando dormir. Quando ela chegar, Tu me faça um favor: dê um manto à ela, que ela me benze a onde eu for”

Maria Gadú

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer primeiramente a Deus, por me atender e guiar sempre e iluminar minhas escolhas.

Agradeço ao meu pai Jetúlio, à sua esposa Giovana e à minha irmã Júlia pelo apoio e carinho. Agradeço aos meus tios, Sidney e Lory, Maria Aparecida, Rosane e Izair, Basílio, Flávio e Elvira, Doralvina, aos meus padrinhos Irani e Iracema pela amizade, carinho, amor e por terem me acolhido nos momentos difíceis. Aos meus primos queridos pela amizade de sempre, em especial à Liliana, Augusto, Fernanda, Deizy e Volnei, Marlei e Éder, Mariana e Maria Eduarda, Madson, Mozara e Roger.

À minha orientadora, Letícia Cruz, não só pelos ensinamentos, mas também pela amizade, confiança, compreensão, carinho e companheirismo. Tenho enorme admiração e, para mim, é um exemplo como profissional e como pessoa. Sou grata por todo o apoio, tanto no laboratório quanto na minha vida pessoal. Agradeço ainda pela oportunidade de fazer parte do grupo LabTec. Obrigada também à professora Scheila Schaffazick pela troca de ensinamentos, carinho e amizade.

Agradeço aos meus amigos do coração, pelo apoio, companheirismo, carinho e paciência, não só durante este período, mas sempre. Em especial à Mayara, Francine, Tuane, Joana, Tatiana, Camila e Lisandro, Aline (Pixu) e Rodrigo, Sara e Lucas, Janaíne, Jamile, Jordana, Juliana, Natássia, Paula e Juliane. Faço um agradecimento especial ao Marcel, amigo querido, que está ao meu lado desde o tempo do colégio em Ijuí, e que a cada dia se torna mais importante.

À minha IC querida e amada, Verônica Cervi, que além de ser uma aluna dedicada e inteligente, me ajudou muito nestes dois anos, tornando-se uma amiga especial e deixando os momentos no laboratório mais agradáveis. Agradeço também a Mailine pela ajuda nos experimentos, pela amizade e por ser tão dedicada e prestativa. Vocês duas foram muito importante durante a minha caminhada.

Aos amigos e colegas do laboratório de Tecnologia Farmacêutica Alessandra, Flábio, Juliana, Marila, Sabrina, Patrícia, Maíra, Carolina, Natháli, Felipe, Allanna, Luan, Laura, Gabriele, Gabriela, Daniela, Luíz Eduardo, Cristina, Camila e Tainara agradeço pelo convívio, colaboração, trocas de aprendizado e momentos de descontração. Agradeço também as colegas do laboratório de Controle de Qualidade e Farmacotécnica, pelo coleguismo e

pelos momentos de boas conversas, em especial à Rose Bueno e a Fernanda Flores. Agradeço a professora Cristiane de Bona pelo empréstimo do ZetaSizer para as análises.

Agradeço a Prof^a Maria Beatriz e sua aluna Paula E. Bitencourt pela análise da atividade antioxidante. Prof.^a Elizandra Braganhol, da UFPEL, e às alunas Elita da Silveira e Juliana Azambuja pela parceria na realização do teste de citototoxicidade. Ao laboratório de Bioquímica Toxicológica, sob orientação da Prof^a Cristina Nogueira, pelos experimentos *in vivo* da atividade antinociceptiva. Faço um agradecimento em especial também aos alunos deste laboratório, que me receberam e me ajudaram, transmitindo muito conhecimento, principalmente o Marcel H. M. Sari e a Vanessa Zborowski.

Agradeço à Universidade Federal de Santa Maria e ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas pela oportunidade e à CAPES pelo suporte financeiro.

RESUMO

Dissertação de Mestrado
Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas
Universidade Federal de Santa Maria

DESENVOLVIMENTO DE NANOEMULSÕES DE ÓLEO DE ROMÃ CONTENDO OU NÃO CETOPROFENO: AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTITUMORAL E ANTINOCICEPTIVA

AUTORA: LUANA MOTA FERREIRA

ORIENTADORA: LETÍCIA CRUZ

Data e Local da Defesa: Santa Maria, 03 de outubro de 2014.

Este trabalho objetivou a preparação de nanoemulsões de óleo de romã, contendo ou não cetoprofeno, e a avaliação da atividade antitumoral e antinociceptiva destas formulações. Pela primeira vez, foram preparadas nanoemulsões com este óleo, pelo método de emulsificação espontânea, e no primeiro momento, foram testadas duas concentrações do óleo, 1,5 e 3,0 %. As formulações foram avaliadas quanto à estabilidade física, atividade antioxidante pelo método do DPPH e antitumoral frente a células de glioma da linhagem C6. Após os estudos de estabilidade física, as formulações apresentaram características físico-químicas adequadas e se mostraram estáveis frente a fenômenos como sedimentação e separação de fases. Em relação à atividade antioxidante, as formulações mantiveram a atividade do óleo de romã em diferentes concentrações. As nanoemulsões, assim como o óleo de romã apresentaram ação antitumoral frente a células de glioma e não foram tóxicas para os astrócitos. Na segunda abordagem do trabalho, foi avaliada a eficácia da combinação do óleo de romã e do cetoprofeno, incorporados em nanoemulsões, como uma perspectiva para o tratamento da dor inflamatória. Estas apresentaram características físico-químicas adequadas após serem submetidas ao estresse mecânico e a mudanças de temperaturas. As nanoemulsões foram capazes de proteger o cetoprofeno frente à degradação UVC e aproximadamente 100 % do fármaco foi liberado em 5 h. No experimento *in vivo* de atividade antinociceptiva, a nanoemulsão branca apresentou efeito até 1 h e as nanoemulsões contendo cetoprofeno até 12 h de pré-tratamento. Em contra partida, o cetoprofeno livre mostrou efeito até 2 h de pré-tratamento. Em relação à curva dose-resposta, o fármaco livre teve efeito até a dose de 0,5 mg/Kg, enquanto que a nanoemulsão contendo cetoprofeno mostrou efeito até a dose de 1,0 mg/Kg. Os parâmetros locomotores não foram afetados, descartando efeitos não específicos.

Palavras-chaves: nanoemulsões, óleo de romã, cetoprofeno, atividade antitumoral, efeito antinociceptivo.

ABSTRACT

Master Dissertation

Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas
Universidade Federal de Santa Maria

DEVELOPMENT OF POMEGRANATE SEED OIL NANOEMULSIONS CONTAINING OR NOT KETOPROFEN: EVALUATION OF ANTITUMOR AND ANTINOCICEPTIVE ACTIVITY

AUTHOR: LUANA MOTA FERREIRA

ADVISOR: LETÍCIA CRUZ

Place and Date of Defense: Santa Maria, October 03, 2012.

This study aimed to prepare nanoemulsions of pomegranate seed oil, containing or not ketoprofen, and to evaluate antitumor and antinociceptive activity. First, pomegranate seed oil nanoemulsions were prepared by spontaneous emulsification method and two oil concentrations were tested. The formulations were evaluated for physical stability, antioxidant activity by DPPH method and antitumor activity against C6 glioma cell line. After physical stability studies formulations presented suitable physicochemical characteristics and were stable against sedimentation and phase separation. In relation to the antioxidant activity, the formulations kept the activity of pomegranate seed oil at different concentrations. Nanoemulsions and pomegranate seed oil showed antitumor action against glioma cells and were not toxic to astrocytes. In the second approach, efficacy of the combination of the pomegranate seed oil and ketoprofen incorporated in nanoemulsions was evaluated, as a promising alternative for treating inflammatory pain. The formulations showed adequate physicochemical characteristics after being subjected to mechanical stress and temperature changes. The nanoemulsions were able to protect ketoprofen against UVC degradation and about 100% of the drug was released in 5 hours. In the evaluation of *in vivo* antinociceptive activity, blank nanoemulsion had effect in 1 h, while nanoemulsion containing ketoprofen during 12 h of pretreatment. In return, the ketoprofen showed effect up to 2 hr of pretreatment. Regarding the dose-response curve, free drug had effect up to a dose of 0.5 mg/Kg, while ketoprofen-loaded nanoemulsion showed effect 1.0 mg/Kg. Locomotor parameters were not affected, discarding non specific effects.

Keywords: nanoemulsions, pomegranate seed oil, ketoprofen, antitumor activity and antinociceptive effect.

LISTA DE FIGURAS

REVISÃO DA LITERATURA

FIGURA 1. Representação esquemática de emulsões: a) emulsão O/A; b) emulsão A/O; c) emulsão A/O/A; d) emulsão O/A/O.....	18
FIGURA 2. Representação esquemática do método emulsificação espontânea.....	21
FIGURA 3. Representação da fruta romã.....	25
FIGURA 4. Representação esquemática da via aferente de transmissão nociceptiva.....	28
FIGURA 5. Ilustração cômica dos cinco sinais da inflamação.....	28
FIGURA 6. Estrutura química do Cetoprofeno.....	30

PUBLICAÇÃO 1: Pomegranate seed oil nanoemulsions with antglioma activity: formulation and *in vitro* evaluations

FIGURE 1. Results of thermal stress experiments: A) droplet size (nm); B) Polydispersity index; C) Zeta potential (mV); and D) pH.....	50
FIGURE 2. Results of heating/cooling cycle: A) droplet size (nm); B) Polydispersity index; C) Zeta potential (mV); and D) pH analyses.....	50
FIGURE 3. Results of cytotoxicity assay in glioblastoma cells (C6): A) Primary astrocyte cells viability; B) Glioblastoma cells viability at 24 h; C) Glioblastoma cells viability at 48h.....	51

PUBLICAÇÃO 2: Improvement of antinociceptive effect of ketoprofen through its association with pomegranate seed oil in nanoemulsions

FIGURE 1. Physical stability: A) Droplet size (nm); B) PDI values; C) Zeta potential (mV); D) pH values; E) Drug content (%).....	69
FIGURE 2. Photodegradation profiles of ketoprofen versus time.....	69
FIGURE 3. Ketoprofen release profiles from NE PSOA KP, NE PSOB KP and methanolic solution (MS KP).....	70
FIGURE 4. Effect of KP (10mg/ kg, i.g.) on acetic acid-induced writhing movements. (A) Time-response curve of free KP (B) for nanoemulsions. Each column represents the mean with S.E.M. of 6–8 animals in each group	70
FIGURE 5. Effect of KP on acetic acid-induced writhing movements. (A) Dose-response curve of free KP and (B) for nanoemulsions. Each column represents the mean with S.E.M. of 6–8 animals in each group.....	71

LISTA DE TABELAS

REVISÃO DA LITERATURA

TABELA 1. Estudos de desenvolvimento de nanoemulsões com diferentes aplicações.....	24
TABELA 2. Constituintes químicos do óleo de romã extraído das sementes.....	26
TABELA 3. Estudos envolvendo a incorporação do cetoprofeno em sistemas nanoestruturados.....	32

PUBLICAÇÃO 1: Pomegranate seed oil nanoemulsions with antiglioma activity: formulation and *in vitro* evaluations

TABLE 1. Characteristics of pomegranate seed oil nanoemulsions.....	49
TABLE 2. DPPH radical scavenging capacity estimation of pomegranate seed oil and nanoemulsion.....	49

PUBLICAÇÃO 2: Improvement of antinociceptive effect of ketoprofen through its association with pomegranate seed oil in nanoemulsions

TABLE 1. Physicochemical characteristics of nanoemulsions.....	68
TABLE 2. Results of spontaneous locomotor activity for nanoemulsions time-response curve.....	68
TABLE 3. Results of spontaneous locomotor activity for nanoemulsions dose-response curve.....	68

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	12
OBJETIVOS	15
1.1 Objetivo geral.....	16
1.2 Objetivos específicos.....	16
REVISÃO DA LITERATURA	17
1.1 Nanoemulsões: aspectos gerais, métodos de preparação, caracterização, estabilidade e aplicações.....	18
1.2 Óleo de Romã.....	25
1.3 Dor, inflamação e cetoprofeno: características gerais, aspectos farmacológicos, terapêuticos e sistemas nanoestruturados.....	27
PUBLICAÇÃO 1: Pomegranate seed oil nanoemulsions with antiglioma activity: formulation and <i>in vitro</i> evaluations.....	33
PUBLICAÇÃO 2: Improvement of antinociceptive effect of ketoprofen through its association with pomegranate seed oil in nanoemulsions.....	52
DISCUSSÃO GERAL	72
CONCLUSÕES	79
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	81

Os sistemas nanoestruturados vêm sendo estudados nos últimos anos por proporcionarem controle da liberação de fármacos, vetorização sítio-específica, aumento da estabilidade, proteção frente à degradação química e enzimática e diminuição de efeitos adversos (COUVREUR; VAUTHIER, 2006; MORA-HUERTAS; FESSI; ELAISSARI, 2010; WU; ZHANG; WATANABE, 2011; KAUR et al., 2014). Dentre esses sistemas, destacam-se as nanoemulsões (NEs) que, devido ao tamanho reduzido e estabilidade frente à sedimentação e cremagem, têm despertado interesse para aplicação na indústria farmacêutica (SADURNÍ et al., 2005; ARAUJO et al., 2011), cosmética (HOELLER et al., 2009; BASPINAR et al., 2010) e de alimentos (ANARJAN et al., 2010; BELHAJ et al., 2010). Além disso, essas gotículas possuem um maior poder de penetração na pele, se distribuem com maior uniformidade no trato gastrintestinal e ainda são consideradas mais estáveis em comparação às emulsões convencionais (ANTON et al., 2008; KOROLEVA e YURTOV, 2012; MAALI; MOSAVIAN, 2013).

As NEs podem ser definidas como a mistura de duas fases imiscíveis, onde uma fase interna está dispersa em uma externa, podendo apresentar-se como O/A ou A/O, e, ainda, como emulsões múltiplas A/O/A ou O/A/O (SOLANS et al., 2005; MASON et al., 2006; BOUYER et al., 2012). O mais comum, em termos de liberação de fármacos, é a utilização de NEs do tipo O/A para veiculação de princípios ativos lipofílicos. Do ponto de vista de produção são de fácil preparação, apresentando em sua constituição basicamente óleo, emulsionantes/estabilizantes, água e princípio ativo (BOUCHEMAL et al., 2004; KOROLEVA e YURTOV, 2012; BRUXEL et al., 2012). Diversos óleos vegetais têm sido aplicados na preparação de NEs, tais como o óleo de soja (SANTOS-MAGALHÃES et al., 2000), óleo de linhaça (GANTA; AMIJI, 2009), óleo de semente de uva (ALMEIDA et al., 2010), óleo de rícino (ARAUJO et al., 2011), dentre outros. Em geral, os óleos vegetais são ricos em substâncias que absorvem radiação na região do ultravioleta, sendo matérias-primas promissoras na estabilização de fármacos fotolábeis (BHALEKAR et al., 2008; AFAQ, 2011).

Nos últimos anos, o óleo de romã (OR) tem atraído interesse de pesquisadores devido à presença de polifenóis, compostos triterpenoides e estrogênicos em sua composição, conferindo a este óleo propriedades antioxidantes, anti-inflamatórias e antitumorais. Além disso, este óleo apresenta em sua composição ácidos graxos insaturados e poli-insaturados, como ácido palmítico, linoleico, e púnico, sendo promissor na prevenção de doenças cardiovasculares e diminuição do colesterol LDL (SCHUBERT et al., 1999; PARASHAR et al., 2010). Devido as suas propriedades e a baixa toxicidade, o OR é uma matéria-prima

promissora para o uso cosmético, alimentício e farmacêutico, podendo ser utilizado para reparar danos de envelhecimento na pele (AFAQ et al., 2009; PARK et al., 2010), como ingrediente de dietas e bebidas (YAMASAKI et al., 2006; MOHAGHEGHI et al., 2011) e no tratamento de doenças tumorais e/ou inflamatórias (SCHUBERT; LANSKY, 1999; SYED et al., 2009).

Portanto, devido às potencialidades relatadas para o OR, este trabalho foi planejado no sentido de explorar suas atividades antitumoral e anti-inflamatória. Desta forma, a primeira parte desta dissertação versa sobre a avaliação da preparação de NEs à base de OR e sua utilização no tratamento de gliomas. Na segunda etapa, o cetoprofeno (CP), um fármaco pertencente à classe dos anti-inflamatórios não esteroides (AINEs), foi associado à estas NEs e as mesmas foram avaliadas em modelo animal de dor inflamatória. É importante ressaltar que não foram encontrados relatos sobre a preparação de NEs à base de OR, pelo método proposto, e tampouco registros sobre a utilização do óleo em células de glioma da linhagem C6 e modelo animal de dor inflamatória.

OBJETIVOS

1.1. Objetivo geral

Desenvolver nanoemulsões de óleo de romã, contendo ou não cetoprofeno, e avaliar *in vitro* a atividade antitumoral em linhagem de glioma e, *in vivo*, a atividade antinociceptiva em modelo animal de dor inflamatória.

1.2 Objetivos específicos

- » Preparar nanoemulsões de óleo de romã pelo método de emulsificação espontânea;
- » Caracterizar as formulações quanto ao tamanho de gotícula, índice de polidispersão, potencial zeta e pH;
- » Avaliar a estabilidade física das formulações de óleo de romã pelo estudo de centrifugação, estresse térmico e ciclo gelo/degelo, avaliando-se as características físico-químicas antes e depois dos estudos;
- » Avaliar a atividade antioxidante do óleo de romã, bem como das nanoemulsões utilizando o radical DPPH;
- » Avaliar *in vitro* a citotoxicidade das nanoemulsões de óleo de romã em linhagem de astrócitos, bem como a atividade antitumoral frente à linhagem C6 de glioma;
- » Desenvolver nanoemulsões de óleo de romã para veiculação do cetoprofeno e caracterizar as formulações em relação ao tamanho de gotícula, índice de polidispersão, potencial zeta, pH, teor de fármaco e eficiência de encapsulamento;
- » Avaliar a estabilidade física das formulações contendo cetoprofeno pelo teste de centrifugação e estresse térmico, realizando acompanhamento das características físico-químicas;
- » Determinar o perfil de fotodegradação do cetoprofeno associado às nanoemulsões frente à radiação UVC;
- » Estudar o perfil de liberação *in vitro* do cetoprofeno a partir das nanoemulsões pelo método de difusão em sacos de diálise;
- » Determinar o efeito antinociceptivo das nanoemulsões de óleo de romã contendo cetoprofeno em modelo animal de contorções abdominais induzidas pelo ácido acético.

1.1 Nanoemulsões: aspectos gerais, métodos de preparação, caracterização, estabilidade e aplicações

Os sistemas nanométricos vêm chamando a atenção na prevenção e tratamento de doenças, uso cosmético, agricultura e tecnologia. Esses sistemas podem atuar controlando a liberação de fármacos, protegendo-os frente à degradação química e enzimática, diminuindo a toxicidade e, conseqüentemente, os efeitos adversos. Além disso, possuem um poder maior de penetração na pele e são amplamente aplicados na indústria alimentícia para o encapsulamento de aromas, sabores e substâncias nutracêuticas (COUVREUR; VAUTHIER, 2006; WU; ZHANG; WATANABE, 2011; KOROLEVA; YURTOV, 2012). Nesse contexto, devido ao tamanho reduzido, maior estabilidade em comparação às emulsões convencionais e facilidade de preparação, as NEs têm atraído interesse de muitos pesquisadores.

Uma emulsão pode ser definida como um sistema contendo duas fases imiscíveis, uma fase interna dispersa em uma fase externa (dispersante). Esses sistemas podem apresentar-se como O/A, onde gotículas de óleo estão dispersas em uma fase externa aquosa ou A/O, onde uma fase aquosa está dispersa em uma fase externa oleosa, ou ainda, como sistemas mais complexos, na forma de emulsões múltiplas O/A/O ou A/O/A (Figura 1). As emulsões podem ser divididas de acordo com o tamanho das gotículas em: micro- (10-100 nm) nano- (100-1000 nm) e macroemulsões (0,5-100 μm). O termo microemulsão pode ser utilizado para denominar líquidos isotrópicos termodinamicamente estáveis formados pela mistura de óleo, água e tensoativos. Já as NEs se assemelham às emulsões convencionais, porém com tamanho reduzido, sendo estas cineticamente estáveis. Muitas das propriedades das emulsões como estabilidade, reologia, aparência, cor e textura dependem do tamanho e de sua distribuição (WINDHAB et al., 2005; JAFARI et al., 2008).

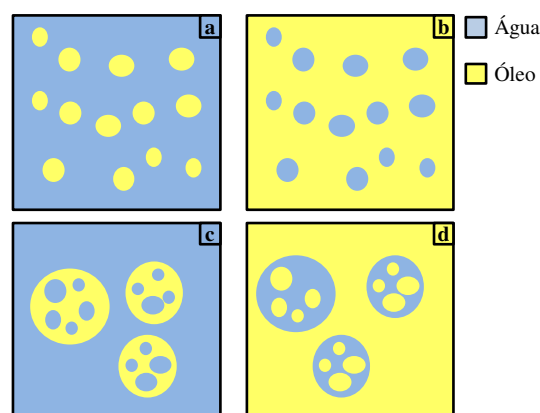


Figura 1. Representação esquemática de emulsões: a) emulsão O/A; b) emulsão A/O; c) emulsão A/O/A; d) emulsão O/A/O.

Como sistemas carreadores de fármacos e ativos cosméticos, as NEs conferem vantagens importantes, tais como: distribuição mais uniforme no organismo, levando a um aumento da biodisponibilidade oral de fármacos, e elevada penetração na pele, podendo ser usadas para tratamentos sistêmicos (PRIMO et al., 2008); proporcionam maior estabilidade frente a fenômenos como sedimentação, cremagem e coalescência; capacidade de controlar a liberação de fármacos; e podem ser utilizadas sob diversas formas farmacêuticas como cremes, sprays e espumas, além da forma líquida (KOROLOVA; YURTOV, 2012; WADHWA et al., 2012; MAALI; MOSAVIAN, 2013). Além disso, em comparação às microemulsões, a preparação das NEs requer uma menor quantidade de tensoativo, o que está relacionado a uma menor toxicidade (BOUCHEMAL et al., 2004; SOLANS; SOLÉ, 2012).

Os constituintes das NEs são de grande importância para a obtenção de gotículas de tamanho reduzido e estáveis, fatores imprescindíveis para a boa estabilidade do sistema (BOUCHEMAL et al., 2004). Para o método de emulsificação espontânea, os principais constituintes são o óleo, agentes emulsionantes, água e o fármaco. O óleo geralmente é selecionado de acordo com a solubilidade do fármaco, apresentando um papel importante na formação das gotículas, por interferir na viscosidade da fase e, conseqüentemente, na estabilidade da formulação. Diversos óleos têm sido estudados para a formação de NEs, tanto de origem sintética, como por exemplo, os triglicerídeos de cadeia média (BOURDON et al., 2000; ALAYOUBI et al., 2013; TAYEL et al., 2013), quanto de origem vegetal, como o óleo de linhaça (GANTA; AMIJI, 2009), óleo de semente de uva (ALMEIDA et al., 2010), óleo de milho (KLNAWY et al., 2012), óleo de soja (GAOE et al., 2012), óleo de gergelim (LARSEN et al., 2013), entre outros (OSTERTAG et al., 2012)

Os tensoativos também possuem um papel de destaque na preparação de NEs. Já está bem elucidado na literatura que o tipo e a concentração do tensoativo podem alterar as características das NEs, tendo impacto na formação e estabilidade das mesmas, já que reduzem a tensão interfacial e/ou aumentam a repulsão entre as gotículas (BOUCHEMAL et al., 2004; OSTERTAG et al., 2012; SABERI et al., 2013). Os tensoativos mais comumente utilizados são os sintéticos como os não iônicos do grupo dos polioxietileno-sorbitanos (Tweens[®]) (ALMEIDA et al., 2010; YANG et al., 2012; SABERI et al., 2013; ALAYOUBI et al., 2013) e dos poloxâmeros (AMBRUS et al., 2009; MISTRY et al., 2012) ou tensoativos de origem natural como as lecitinas (DESAI et al., 2008; FILIPPIN et al., 2008; BAE et al., 2009).

Os métodos de preparação das NEs foram recentemente revisados e são basicamente divididos em métodos que requerem alta ou baixa energia para a formação das gotículas

(MAALI; MOSAVIAN, 2013). Os métodos de alta energia em geral, são baseados na preparação de uma emulsão grosseira seguida por uma diminuição do tamanho da gotícula utilizando diferentes tipos de equipamentos (JAFARI et al., 2008). Dentre as técnicas que requerem alta energia destaca-se a microfluidização (CONSTANTINIDES et al., 2008), a qual utiliza uma bomba que atua em alta pressão, cerca de 124 mPa, forçando a emulsão grosseira a passar por microcanais, chegando até uma câmara de interação onde as gotículas se chocam, formando, assim, uma emulsão fina devido ao elevado cisalhamento.

Outro método eficaz na preparação de NEs e que utiliza alta energia é a sonicação, porém é uma técnica utilizada apenas para pequenas escalas. A redução do tamanho ocorre pela emissão de ondas interfaciais instáveis que reduzem as gotículas primárias em gotículas de tamanho nanométrico. O tempo e a intensidade da sonicação podem alterar o tamanho das gotículas, ou seja, quanto maior o tempo e a intensidade, menor será o diâmetro destas (SOLANS et al., 2005; JAFARI et al., 2008).

Por fim, na homogeneização a alta pressão as gotículas são submetidas a um elevado cisalhamento pela passagem da formulação através de um anel de impacto. A turbulência gerada por esta passagem faz com que haja a redução do tamanho das gotículas. Nesse caso, quanto maior a rotação do anel e a pressão exercida, menores serão as gotículas. Esses métodos são muito efetivos na redução do tamanho da gotícula, mas sua utilização pode ser limitada para fármacos lábeis e macromoléculas (CONSTANTINIDES, 2008).

Já os métodos que requerem baixa energia baseiam-se no controle dos fenômenos de interface envolvidos na interação óleo-água e dependem do tipo de moléculas ativas presentes, ou seja, de sua solubilidade e geometria molecular. A emulsificação por inversão de fase pode ocorrer de duas formas, sendo que uma delas se dá devido a alterações na temperatura (SHINODA; SAITO, 1968) que, por sua vez, modifica a solubilidade dos tensoativos não-iônicos, afetando seu equilíbrio hidrofílico-lipofílico. À baixa temperatura, a monocamada dos tensoativos apresenta uma curvatura positiva, fazendo com que a emulsão seja do tipo O/A. Quando ocorre uma elevação da temperatura, a monocamada apresenta uma curvatura de carga negativa, invertendo o sentido das micelas, formando uma emulsão A/O (SOLANS et al., 2005; SOLANS; SOLÉ, 2012; OSTERTAG et al., 2012). À temperatura constante, a inversão de fases pode ocorrer pela alteração da composição das fases durante o processo de emulsificação, alterando novamente o equilíbrio hidrofílico-lipofílico do tensoativo (SOLANS et al., 2005). A inversão pode acontecer pela adição gradual de água em uma mistura de óleo e tensoativos ou ainda, pela adição de eletrólitos, outros tensoativos e álcoois (SADURNÍ et al., 2005; KOROLEVA; YURTOV, 2012).

Além disso, ainda existe a preparação pela técnica de emulsificação espontânea (Figura 2), a qual se baseia na difusão de um solvente orgânico, miscível em água, da fase oleosa para a fase aquosa. Uma fase orgânica constituída de óleo, tensoativo e solvente orgânico é adicionada a uma fase aquosa contendo um tensoativo hidrofílico, dessa forma, ocorre a difusão do solvente e as gotículas de óleo são formadas instantaneamente para atingir o equilíbrio do sistema. O solvente orgânico é removido do sistema permanecendo apenas as gotículas de óleo dispersas na água. Essa técnica depende de vários parâmetros como a tensão interfacial, viscosidade das fases, concentração e tipo de tensoativo, podendo interferir diretamente no tamanho das gotículas formadas (BOUCHEMAL et al., 2004; SOLANS et al., 2005).

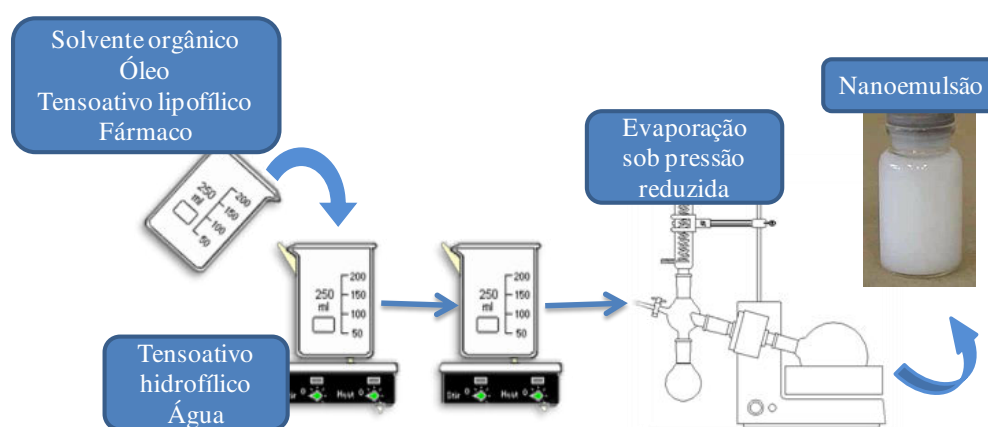


Figura 2. Representação esquemática do método emulsificação espontânea

Após a preparação, as NEs podem ser caracterizadas de acordo com o pH, o qual pode ser indicativo da estabilidade da formulação, visto que um pH mais ácido pode ser devido a presença de ácidos graxos livres na formulação, provenientes da hidrólise do tensoativo ou do óleo (BRUXEL et al., 2012; TANG et al., 2013). A determinação do tamanho médio de gotícula e sua distribuição são de extrema importância na caracterização das NEs, pois estes podem influenciar na estabilidade, bem como no desempenho biológico da formulação. Estas características são influenciadas por vários fatores como o tipo e concentração de óleo e tensoativo, a temperatura e a velocidade de agitação durante o preparo (OSTERTAG et al., 2012; SABERI et al., 2013). Para a determinação do tamanho médio e distribuição das gotículas, o método mais usual é a espectroscopia de correlação de fótons (PCS) (ARAÚJO et al., 2011; SEVCIKOVA et al., 2012; SABERI et al., 2013; TANG et al., 2013), ou ainda pode ser realizada pela técnica de impedância elétrica, utilizando um contador Coulter (BOUCHEMAL et al., 2004).

Outra caracterização importante é a avaliação do potencial zeta, o qual reflete a carga de superfície da gotícula, e que pode ser influenciado por alterações na interface ou presença de moléculas iônicas adsorvidas na superfície. É um indicativo de estabilidade, visto que valores elevados estão relacionados a fenômenos de repulsão entre as gotículas, prevenindo assim fenômenos de agregação (SCHAFFAZICK et al., 2003; BOUYER et al., 2012). A técnica usual para a determinação do potencial zeta é a mobilidade eletroforética. No caso de haver fármacos incorporados a NEs, determina-se também o teor total e a eficiência de encapsulamento. O teor total determina-se pela extração do fármaco com solvente adequado e a eficiência de encapsulamento pela técnica de ultrafiltração-centrifugação, ou ainda pela simples visualização de cristais de fármaco por microscopia. A determinação da eficiência de encapsulamento é de extrema importância, visto que o conteúdo de fármaco associado às gotículas pode interferir nas características do sistema, e vice-versa. Dentre os fatores que podem interferir na associação do fármaco destacam-se as características físico-químicas do próprio fármaco, o pH do meio, as características de superfície da gotícula e a natureza do óleo (BRUXEL et al., 2012).

Também é importante avaliar a cinética de liberação do fármaco a partir das NEs. De acordo com a literatura, as NEs são capazes de proporcionar uma liberação controlada de fármacos lipofílicos incorporados. Visando tal avaliação, o método de difusão em sacos de diálise é o mais empregado (ARAÚJO et al., 2011; BRUXEL et al., 2012).

As NEs também têm sido desenvolvidas com a prerrogativa de aumentar a estabilidade de substâncias fotolábeis. A presença do óleo pode desempenhar um papel importante nesta avaliação, tendo em vista que uma alta solubilidade do fármaco no óleo pode melhorar a fotoestabilidade de substâncias fotolábeis (ALMEIDA et al., 2009). Além disso, esta avaliação também pode sugerir a localização do fármaco internamente no nanosistema, levando em conta que moléculas de fármaco que se encontram mais na superfície podem apresentar uma maior degradação do que aquelas que estão dissolvidas ou associadas mais internamente. Esta avaliação pode ser feita submetendo as formulações a uma fonte artificial de radiação ultravioleta, uma vez que pode haver formação de produtos de degradação ou alteração nas características da formulação (BHALEKAR et al., 2008; ALMEIDA et al., 2010).

Outra avaliação relevante diz respeito à estabilidade da formulação, pois diversos fenômenos de instabilidade podem ocorrer, tais como sedimentação e cremagem, os quais ocorrem pela ação da gravidade e da força centrífuga, respectivamente. Quando as gotículas são mais densas que a fase externa elas tendem a sedimentar, e quando ocorre o contrário, ou

seja, a densidade das gotículas é menor que a da fase externa, as gotículas se acumulam na superfície. Outro fenômeno de instabilidade é a floculação, que envolve a agregação das gotículas em aglomerados frouxos, dentro da emulsão. A floculação precede a coalescência, por isso deve ser evitada para que se mantenha a estabilidade da emulsão (KOROLEVA; YURTOV, 2012; BOUYER et al., 2012). As técnicas de caracterização citadas anteriormente são essenciais para o acompanhamento destes fenômenos e para avaliar as mudanças na formulação durante o tempo de armazenamento e, dessa forma, pode-se estimar o melhor período e as melhores condições para o acondicionamento do produto.

Já foi relatado na literatura o uso de NEs na terapia antitumoral (BOURDON et al., 2000; PRIMO et al., 2007; DESAI et al., 2008; MENDES et al., 2009; GANTA; AMIJI, 2009; MOHAN; RAPOPORT, 2010; GAOE et al., 2012; PATEL et al., 2013) e anti-inflamatória (BABOOTA et al., 2007; KUO et al., 2008; SHAKEEL et al., 2010; TANG et al., 2012). Além disso, foram aplicadas na liberação ocular (TAYEL et al., 2013), parenteral (ARAÚJO et al., 2011), oral (SUN et al., 2012; MONTEIRO et al., 2012; LI et al., 2013; ZHANG et al., 2013; LARSEN et al., 2013) e dérmica (PRIMO et al., 2008; HOELLER et al., 2009; JUNYAPRASERT et al., 2009; BASPINAR et al., 2010). A tabela 1 reúne informações a respeito dos estudos de desenvolvimento de NEs considerados mais relevantes. Óleos com propriedades terapêuticas também já foram estudados como constituintes de fase oleosa, como a vitamina E (KUO et al., 2008; SABERI et al., 2013), óleo de canela (GHOSH et al., 2013), óleo de limão (SALVIA-TRIJILLO et al., 2013), citronela (NUCHUCHUA et al., 2009), óleo essencial de *Melaleuca alternifolia* (FLORES et al., 2011), óleo de milho (ZIANI et al., 2011), óleo de rícino (KELMANN et al., 2007), óleo de semente de uva (ALMEIDA et al., 2010), entre outros.

Tabela 1. Estudos de desenvolvimento de nanoemulsões com diferentes aplicações

Fármaco	Atividade terapêutica	Fase interna	Fase externa	Método de preparação	Referência
Temoporfina	Antitumoral	Miglyol 812N [®] / Epikuron [®] 170	Poloxamer 188 [®]	EE	PRIMO et al., 2007
Paclitaxel/ Curcumina	Antitumoral	Óleo de linhaça	Lecitina de ovo	U	GANTA-AMIJI et al., 2009
Docetaxel	Antitumoral	Óleo de soja /lecitina de ovo	Poloxamer 188 [®]	HAP	GAOE et al., 2012
Talidomida	Sedativo, hipnótico	Óleo de rícino/ lecitina de soja	Glicerol/ Tween 80 [®]	EE	ARAÚJO et al., 2011
Indometacina	Anti-inflamatória	Labrafil M1944CS	Tween 80 [®] / Transcutol HP	EE	SHAKEEL et al., 2010
Anfotericina B	Antifúngica	Miglyol 812N [®] / lecitina de soja/ colesterol	-	U	FILLIPIN et al., 2008
Fluconazol	Antifúngica	Capmul MCM	Tween 80 [®]	EE	PATHAK et al., 2013
Carbamazepina	Anticonvulsivante	Óleo de rícino: Miglyol 810 [®] / lecitina de soja	Tween 80 [®]	EE	KELMANN et al., 2007
Rutina	Antioxidante	Óleo de semente de uva/ Span 60	Tween 80 [®]	EE	ALMEIDA et al., 2010
Resveratrol	Antioxidante	Miglyol Miglyol 812N [®]	Montanox [®]	EE	AMRI et al., 2014
Ubiquinol-10	Antioxidante	Miglyol 810 [®]	Lecitina de soja	HAP	ZHAO et al., 2013

*EE – Emulsificação Espontânea; U – Ultrasonicação; HAP: Homogeneização de Alta Pressão.

1.2 Óleo de Romã

A romãzeira (*Punica granatum*) é uma árvore pertencente à família Punicaceae, nativa da Ásia e Mediterrâneo e, nos últimos anos, seu cultivo se disseminou para outras regiões do mundo. A fruta (Figura 3) divide-se em três partes, as sementes, polpa e casca, sendo rica em compostos fenólicos, incluindo catequinas, antocianinas e outros flavonoides complexos, além de taninos hidrolisáveis e esteroides como cumestrol, α -estradiol, testosterona, estigmasterol, entre outros (SINGH et al., 2002; SYED et al., 2007; LANSKY; NEWMAN, 2007). Na medicina popular, a romã e suas preparações foram relatadas como eficazes para o tratamento de cólica, colite, diarreia, disenteria, além de apresentarem propriedades como vermífugos, adstringentes, antiespasmódicos e diuréticos (SCHUBERT et al., 1999).



Figura 3. Representação da fruta romã (<http://nutricaojoyce.com.br/beneficios-da-roma>)

As sementes da romã são ricas em ácidos graxos poli-insaturados, vitaminas, polissacarídeos, polifenóis e minerais. Quando moídas e secas, as sementes produzem um óleo, o qual pode ser extraído por métodos mecânicos ou químicos. Os métodos químicos são os mais aplicados e dentre eles destacam-se a extração por Soxhlet (ABBASI et al., 2007), irradiação por micro-ondas e ultrassônica (GOULA, 2012; TIAN et al., 2013), extração com solvente superaquecido (EIKANI et al., 2012) e por fluido supercrítico (AHANGARI; SARGOLZAEI, 2012; LIU et al., 2012).

Na tabela 2 encontram-se os principais constituintes presentes no OR extraído das sementes. Entre os ácidos graxos presentes figuram os ácidos oleico, palmítico e esteárico (SCHUBERT et al., 1999). Estão presentes ainda componentes polifenólicos, como flavonoides e ácido elágico (WANG et al., 2004), além de triterpenoides e estrogênio, os quais conferem ao óleo propriedades antioxidantes, antitumorais e anti-inflamatórias. A

atividade antioxidante do óleo é baseada na eliminação de radicais livres e diminuição do estresse oxidativo e a peroxidação lipídica (SINGH et al., 2002; BEKIR et al., 2013). Além disso, este óleo ainda atua inibindo a atividade da ciclo-oxigenase (COX), enzima importante na rota metabólica do ácido araquidônico e das prostaglandinas, mediadores inflamatórios (LANSKY; NEWMAN, 2007; BEKIR et al., 2013). O OR pode inibir também a proliferação de diferentes tipos de células tumorais, rompendo o ciclo celular, induzindo a apoptose e, conseqüentemente, reduzindo o crescimento de tumores (ASLAM et al., 2006; LANSKY; NEWMAN, 2007; SYED et al., 2007), tais como de pele, mama e próstata (KIM et al., 2002; ALBRECHT et al., 2004; JOHANNINGSMEIER et al., 2011). A presença dos diversos ácidos graxos na composição do OR tem um papel importante na prevenção de doenças cardiovasculares por reduzirem teores de colesterol (PARASHAR et al., 2010).

Tabela 2. Constituintes químicos do óleo de romã extraído das sementes.

Constituintes	Quantidade (%)
Ácidos graxos	
Triglicerídios	88,0
Diacilgliceróis	7,0
Fosfolipídios	3,0
Ácido púnico	65,0
Ácido linoleico	7,0
Ácido docosanoico	1,3
Ácido tetracosanoico	1,4
Campesterol	0,1
Estigmasterol	0,1
β -Sitosterol	1,0
γ -Tocoferol	1,0
17- α -Estradiol	0,3

Fonte: ASLAM et al., 2006

Recentemente, Mizrahi e colaboradores (2014) desenvolveram NEs de OR com propósito de utilização em doenças neurodegenerativas. No trabalho em questão o método utilizado foi o de sonicação, obtendo-se gotículas com diâmetro em torno de 150. A formulação proposta continha 1,56 g de OR, 0,65 g de Tween 80[®] e 0,39 g de monooleato de

glicerila e água. Os resultados mostraram que as NEs de OR reduziram a morte neuronal, bem como a peroxidação lipídica e ainda aumentaram a neurogênese, fator importante no tratamento de condições neurodegenerativas. Além disso, a formulação pode retardar o início, bem como a progressão da doença em um tempo mais curto e em dose mais baixa comparado ao óleo natural. O efeito neuroprotetor foi explicado devido à presença de ácidos graxos poli-insaturados, os quais podem atravessar a barreira hematoencefálica com mais facilidade e consequentemente aumentar a biodisponibilidade da formulação em estudo.

1.3 Dor, inflamação e cetoprofeno: características gerais, aspectos farmacológicos, terapêuticos e sistemas nanoestruturados

O processo inflamatório e a dor exercem um papel muito importante na homeostasia do organismo. O primeiro representa o reparo tecidual ou trauma, e o segundo atua como um sistema de alerta, salientando a presença de perigo iminente (WOOLF e SALTER, 2000). A dor é uma qualidade sensorial complexa e indefinida, pois envolve múltiplos fatores (BASBAUM et al., 2009). Além da nocicepção, definida como o componente fisiológico da dor, este processo também envolve componentes cognitivos, afetivos e emocionais (JULIUS e BASBAUM, 2001; NEUGEBAUER et al., 2009). Os termos nocicepção e antinocicepção são empregados para animais e sua avaliação é feita indiretamente através do componente fisiológico (TJOLSEN e HOLE, 1997; ALMEIDA et al., 2004).

A detecção de estímulos nocivos (calor ou frio excessivo, substâncias químicas e estímulos mecânicos) oriundos da periferia, ocorre pela ativação de terminações nervosas livres, ligadas a fibras aferentes sensoriais pouco mielinizadas ou não mielinizadas (A δ e C, respectivamente), chamadas nociceptores (ALMEIDA et al., 2004). De maneira simplificada, os nociceptores, através de neurônios de primeira ordem, levam informações da periferia para o córtex cerebral, fazendo conexões com neurônios de segunda ordem, localizados na medula espinhal (Figura 4) (MESSLINGER, 1997; BASBAUM et al., 2009).

A sensibilização dos nociceptores é geralmente resultado de alterações associadas ao processo inflamatório, como modificações no padrão dos mediadores químicos (WOOLF e SALTER, 2000). Consequentemente, a lesão tecidual está comumente ligada ao acúmulo de mediadores endógenos liberados de nociceptores ativados ou de células não neuronais que residem ou infiltram a área lesionada, como macrófagos e neutrófilos (SCHAIBLE et al., 2010).

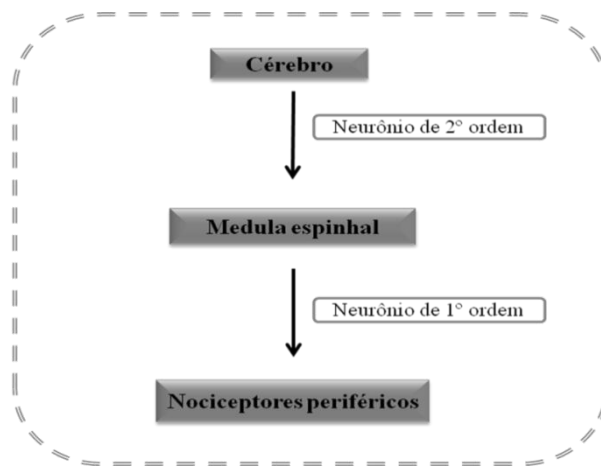


Figura 4. Representação esquemática da via aferente de transmissão nociceptiva. Fonte: adaptado de BASBAUM et al., 2009.

A inflamação é uma resposta do tecido à lesão celular e caracteriza-se por um processo complexo, dinâmico e multimediado, que pode se manifestar a partir de agentes lesivos físicos, químicos ou biológicos (COTRAN; KUMMAR; ROBINS, 2006). A resposta inflamatória é caracterizada basicamente por três etapas: a primeira, onde ocorre vasodilatação e aumento do fluxo sanguíneo no local; a segunda alteração baseia-se na ativação de células endoteliais e dos leucócitos circulantes, levando a um aumento da permeabilidade vascular com exsudação de líquido para os tecidos; e por fim, na terceira etapa, ocorre degeneração tecidual, podendo causar dor através da ativação e sensibilização de nociceptores, ocasionada pelo edema local (HUERRE; GOUNUN, 1996; LEES et al., 2004; VERRI et al., 2006). Todas essas alterações causadas pelo processo inflamatório foram caracterizadas clinicamente 30 a.C. por médicos romanos, que descrevem o processo em cinco sinais cardinais: calor, rubor, edema, dor e perda da função do órgão (Figura 5).



Figura 5. Ilustração cômica dos cinco sinais da inflamação. Fonte: www.biomaterial.com.br/inflama/sinais.html

O extravasamento plasmático contribui para a ativação de uma série de proteases inativas, componentes de quatro cascatas enzimáticas proteolíticas: o sistema complemento, o sistema de coagulação, o sistema fibrinolítico e o sistema das cininas. Essa ativação desencadeia a formação de substâncias quimiotáticas que atraem células e estimulam a liberação de diversos mediadores inflamatórios, destacando-se a histamina, bradicinina, serotonina, produtos da cascata do ácido araquidônico e ATP. Os macrófagos e leucócitos recrutados pelos sítios de lesão celular desempenham um papel fundamental no desenvolvimento do processo inflamatório mediante liberação de fatores de regulação da fase aguda como a interleucina-1, interleucina-6 e o fator de necrose tumoral α (TNF- α) (HUERRE; GOUNUN, 1996; VERRI et al, 2006). Além disso, os macrófagos e neutrófilos liberam uma variedade de substâncias tóxicas de seus grânulos, como oxidantes como as espécies reativas de oxigênio e nitrogênio, e enzimas, como mieloperoxidase, elastase, proteinases entre outras, promovendo a indução de fatores transcricionais, como NF- κ B, bem com perda de estoques energéticos celulares, rompimento de mitocôndrias, peroxidação e destruição de membranas e dano em moléculas do DNA (MEDZHITOV, 2008; SILVA, 2010).

Por se tratar de um processo multimediado, diversos componentes do mecanismo fisiopatológico da reação inflamatória poderiam ser alvos para a ação de fármacos anti-inflamatórios. Um dos possíveis mecanismos seria bloquear, inicialmente, a formação de moléculas de adesão e quimiocinas, interferindo na migração transendotelial das células inflamatórias e consequentemente inibir a cascata de formação dos mediadores inflamatórios. Outro mecanismo de ação está baseado na inibição das enzimas específicas envolvidas na síntese de mediadores inflamatórios, como as fosfolipases, lipoxigenase, ciclo-oxigenase e calicreínas (SILVA, 2010).

Dentre os agentes terapêuticos empregados no tratamento da dor e inflamação, os AINEs estão entre os mais utilizados, contabilizando cerca de 5% das prescrições médicas em todo o mundo (SMALLEY et al, 1995). Os AINEs constituem um grupo heterogêneo de compostos que possuem funções terapêuticas em comum, ou seja, são analgésicos, antipiréticos e anti-inflamatórios. Estes fármacos, ao inibirem a síntese de prostaglandinas (PGI₂, PGE₁ e PGE₂), diminuem a vasodilatação, causam efeitos inibitórios nos nociceptores, centro termorregulador hipotalâmico e modulam os sinais e sintomas da inflamação (FELDMAN; McMAHON, 2000). Segundo a Associação Americana de Reumatologia, dentre as doenças crônicas existentes, as doenças reumáticas são as que mais

afetam os indivíduos, sendo os AINEs os fármacos de escolha no alívio dos sintomas dessas doenças, a fim de melhorar a qualidade de vida dos pacientes (BORNE, 2008).

Dentre os representantes desta classe encontra-se o CP (Figura 4), um AINE pertencente à classe do ácido propiônico, sendo considerado um dos mais potentes inibidores da COX dentro das concentrações terapêuticas. Além de inibir a síntese de prostaglandinas, o fármaco atua inibindo a via lipo-oxigenase da cascata do ácido araquidônico, e tem ação como um potente inibidor da bradicinina e estabiliza as membranas lisossômicas contra a alteração osmótica, impedindo a liberação de enzimas que medeiam reações inflamatórias e causam destruição tecidual (ASHVINI et al., 2011).

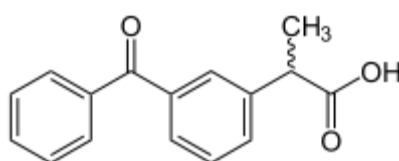


Figura 6. Estrutura química do Cetoprofeno

O CP é caracterizado como um pó branco e cristalino e é praticamente insolúvel em água. Quando administrado pela via oral é rapidamente absorvido. A presença de alimentos no trato gastrointestinal diminui a velocidade, mas não a extensão da absorção. Possui alta ligação às proteínas plasmáticas, atinge sua concentração máxima entre 0,5 – 2 horas, sofre biotransformação hepática e apresenta meia vida de distribuição de 20 minutos e meia vida de eliminação de 3 horas, sendo que cerca de 60% é eliminado na urina na forma de glucoronídeo e 40% é eliminado pela via entero-hepática. Tem ação antirreumatóide, anti-inflamatória, analgésica, antigotosa, antidismenorréica e tem ação supressora da cefaleia (KOROLKOVAS; FRANÇA, 2001).

O CP já foi relatado como fármaco fotolábil (MAS; TAULER; JUAN, 2011) e, quando exposto à radiação UV ou visível sofre descarboxilação, formando um carbânion que ainda passa por uma protonação, gerando a 3-etilbenzofenona (TONNESEN, 2001; ALBINI; FASANI, 1998). Durante esse processo pode haver a formação de radicais livres de alta energia induzindo a peroxidação lipídica e alterações no DNA das células, causando, por exemplo, reações alérgicas quando utilizado na pele (CHOI et al., 2011). Além dos malefícios biológicos, a formação do produto de degradação pode interferir na análise do CP, bem como alterar propriedades organolépticas das formulações. Desta forma, torna-se interessante o desenvolvimento de um sistema que proporcione um aumento da fotoestabilidade do CP.

A principal limitação ao emprego terapêutico do CP está relacionada aos efeitos lesivos no trato gastrointestinal. Seus efeitos adversos podem ser atribuídos ao contato direto do fármaco com a mucosa gástrica e, por ação sistêmica, após absorção. Esses efeitos se devem, principalmente, a inibição da síntese de prostaglandinas citoprotetoras no estômago. Entretanto, substâncias ácidas podem induzir um dano tóxico, pois em pH baixo, ácidos orgânicos fracos tornam-se moléculas não-ionizadas com características apolares, o que lhes permite atravessar a membrana mucosa e acumular-se nas células epiteliais. Com a mudança de pH ácido para neutro no interior da mucosa, o fármaco torna-se ionizado acumulando-se no interior das células epiteliais, causando danos às mesmas (FIORUCCI; ANTONELLI; MORELLI, 2001). Diante disso, a incorporação do CP em um sistema que reduza seu contato direto com a mucosa pode ser uma abordagem promissora na redução dos efeitos adversos. O CP já foi incorporado em diferentes sistemas nanoestruturados. A tabela 3 relaciona alguns exemplos de estudos.

Tabela 3. Estudos envolvendo a incorporação do cetoprofeno em sistemas nanoestruturados

Sistema	Método de preparação	Constituição	Objetivo	Caracterização	Referência
Nanoemulsão	Emulsificação espontânea	Álcool benzílico/ Solutol [®] HS 15/ etanol	Administração tópica	DM: 58-226 nm;	KIM et al., 2008
Nanoemulsão	Emulsificação espontânea	Ésteres de óleo de palma/ Tween 80 [®]	Administração tópica	DM: 229 nm	SAKEENA et al., 2010
Nanopartículas	Emulsificação/ evaporação de solvent	CB6/ tampão fosfato	Liberação controlada	DM: 233-306 nm	HOAI et al., 2012
Nanopartículas	Emulsificação/ evaporação de solvente	PLGA/ PVA/ Quitosana/ Tween 80 [®]	Liberação percutânea	DM: 163-159 nm; PZ: 11,17-16,76 mV; IPD: 0,12-0,18; EE: 81,27- 92,81%	SHAH et al., 2012
Nanopartículas	Difusão de solvente	Poli(D,L, ácido lático)/ PVA	Administração tópica	DM: 144±1,80 nm; PZ - 27,6±0,82 mV; IPD: <0,2; EE: 75,3±0,96 %	VUCEN et al., 2013
Nanopartículas lipídicas sólidas	Método de microemulsão à quente	Cera de abelha/ cera de carnaúba/ lecitina de ovo/ Tween 80 [®]	Liberação controlada	DM: 82±2,43 nm; PZ: - 15,52±1,32; IPD: 0,26±0,02; EE: 96,53±0,23	KHERADMA NDNIA et al., 2010
Nanocápsulas	Deposição interfacial de polímero pré- formado	Migliol/PCL/ Span 80 [®] / Tween 80 [®]	Avaliação da atividade frente ao glioma	DM: 270 nm; PZ negativo; IPD < 0,2	DA SILVEIRA et al., 2013
Nanocápsulas	Deposição interfacial de polímero pré- formado	Óleo de rosa mosqueta/ Eudragit S100 [®] / Span 80 [®] / Tween 80 [®]	Avaliação da citotoxicidade em fibroblastos	DM: 180-197 nm; PZ: -8,7 - -21,8 mV; IPD: 0,13-0,26; EE: >90%	RIBAS, 2013

*DM: diâmetro médio; PZ: potencial zeta; IPD: índice de polidispersão; EE: eficiência de encapsulamento; CB6: monômeros de glicoluril metilado

PUBLICAÇÃO 1: Pomegranate seed oil nanoemulsions with selective antiglioma activity: formulation and *in vitro* evaluations

Short communication submetido ao periódico Food Chemistry

Pomegranate seed oil nanoemulsions with selective antiglioma activity: formulation and *in vitro* evaluations

Luana Mota Ferreira^a, Verônica Ferrari Cervi^a, Mailine Gehrcke^a, Paula Eliete Rodrigues Bitencourt^a, Maria Beatriz Moretto^a, Elita F. da Silveira^b, Juliana H. Azambuja^b, Elizandra Braganhol^b, Letícia Cruz^a

^aPrograma de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS, Brasil

^bPrograma de Pós-Graduação em Bioquímica e Bioprospecção, Centro de Ciências Químicas, Farmacêuticas e de Alimentos, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, RS, Brasil.

Abstract

The present study showed the development of pomegranate seed oil nanoemulsions as an alternative for the treatment of glioma. For this, two oil concentrations (1.5 and 3.0 %) were tested and evaluated regarding the physical stability through centrifugation test, thermal stress and heating/cooling cycle. The results showed that both formulations can be considered stables against instabilities phenomena, regardless oil concentration. Considering that oxidative stress is related to tumor development, the formulations were evaluated in terms of DPPH scavenging activity and antitumor activity against C6 glioma cells. Also, a test was conducted with astrocyte cells. The results showed that the nanoemulsification of pomegranate seed oil did not promote changes in its antioxidant activity. Moreover, the formulations showed high antiglioma activity without reducing astrocyte viability.

Keywords: Nanoemulsion, pomegranate seed oil, antioxidant activity, antitumor activity

1. Introduction

Pomegranate (*Punica granatum*), a native fruit of Asia and Mediterranean, has been studied as a functional and nutraceutical source in recent years. Pomegranate seeds are rich in sugars, polyunsaturated fatty acids, vitamins, polysaccharides, polyphenols and minerals. When crushed and dried, the seeds produce an oil which can be extracted by mechanical or chemical methods (Syed, Afaq, & Mukhtar, 2007).

The main constituents of PSO are conjugated fatty acids, including oleic, linoleic, palmitic, punic and stearic acids, that have an important role in preventing cardiovascular disease by reducing cholesterol levels and promoting an anti-atherogenic effect (Mirmiran, Fazeli, Asghari, Shafiee, & Azizi, 2010; Schubert, Lansky, & Neeman, 1999). Due to the phenolic and flavonoid contents, PSO presents antioxidant activity by elimination of free radicals, decrease in oxidative stress and lipid peroxidation, which plays an important role in the prevention and treatment of cancer (Poulsen, Prieme, & Loft, 1998; Schubert, Lansky, & Neeman, 1999). PSO may also inhibit the proliferation of different types of tumor cells, disrupting the cell cycle by inducing apoptosis and thus reducing the tumor growth (Aslam, Lansky, & Varani, 2006; Lansky & Newman, 2007). For this reason, PSO is a promising alternative that may be used in breast, prostate and skin cancer therapy (Albrecht, Jiang, Kumi-Diaka, Lansky, Gommersall, Patel, et al., 2004; Johanningsmeier & Harris, 2011; Kim, Mehta, Yu, Neeman, Livney, Amichay, et al., 2002). However, until now, no study has shown the antiproliferative effect of PSO against glioma cells.

Glioma is a type of brain tumor originated from glial cells. It presents a poor prognosis for patients due to its rapid proliferation and infiltrative growth. Moreover, malignant gliomas are resistant to therapeutic strategies. Another aspect that contributes to drug resistance is the poor penetration of many drugs across the blood-brain barrier (Behin, Hoang-Xuan, Carpentier, & Delattre, 2003). In this sense, nanostructured carriers have shown promising

results in terms of enhancing drug transport across the blood-brain barrier (da Silveira, Chassot, Teixeira, Azambuja, Debom, Beira, et al., 2013).

Considering the numerous potentialities of PSO, it is relevant the incorporation of this oil in an effective and stable system for its administration. In this regard, nanoemulsions are very attractive colloidal systems for therapeutic and nutritional oils. By definition, nanoemulsions are kinetically stable emulsion systems in which the oil droplets are dispersed in an external aqueous phase stabilized by a thin layer of emulsifier (Bouchemal, Briancon, Perrier, & Fessi, 2004). Due to their small droplet size (100 – 500 nm), instability phenomena caused by gravitational flocculation, creaming, sedimentation and/or coalescence are prevented. Besides the kinetic stability, the smaller droplet size of nanoemulsions becomes the formulations less viscous and more translucent or transparent than conventional emulsions (C. Solans, Izquierdo, Nolla, Azemar, & Garcia-Celma, 2005). Moreover, due to their reduced droplet size, nanoemulsions have been studied to increase the bioavailability of drugs, to enhance skin penetration, to improve water solubility of lipophilic compounds and to ameliorate the stability of labile substances.

Taking all of this into account, the aim of this study was to prepare and characterize PSO nanoemulsions, as well as to evaluate their physical stability, antioxidant activity and antiproliferative effect against glioma cells.

2. Materials and methods

2.1 Materials

Pomegranate seed oil was purchased from ViaFarma (São Paulo, Brazil). Span 80[®] (sorbitan monooleate), Dimethylsulphoxide (DMSO), 3(4, 5-dimethyl)-2,5diphenyl tetrazolium bromide (MTT), and 1'1-dipphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) were acquired from Sigma Aldrich (São Paulo, Brazil). Tween 80[®] (polysorbate 80) was furnished by Delaware

(Porto Alegre, Brazil). Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM), Fungizone, penicillin/streptomycin, 0.25 % trypsin/EDTA solution and fetal bovine serum (FBS) were obtained from Gibco (Gibco BRL, Carlsbad, CA, USA). Ultrapure water was obtained from Milli-Q[®] Plus apparatus. All other solvents and reagents were analytical grade and used as received.

2.2 Preparation of nanoemulsions

Nanoemulsions were prepared by spontaneous emulsification, according to the method described by Bouchemal and co-workers (Bouchemal, Briancon, Perrier, & Fessi, 2004), with some minor modifications. In brief, pomegranate seed oil (1.5 % (w/v) – NE PSOA or 3.0 % (w/v) – NE PSOB) and Span 80[®] (0.077 g) were solubilized in acetone (50 mL). After 60 minutes under moderate stirring this organic phase was added in a Tween 80[®] (0.077 g) aqueous phase (50 mL). The O/W emulsion was formed instantaneously by diffusion of the organic solvent in the aqueous phase, forming the nanodroplets. The magnetic stirring was kept for 10 min and then, the organic solvent was eliminated by evaporation under reduced pressure to achieve 10 mL of final volume. The formulations were prepared in triplicate.

2.3 Characterization of nanoemulsions

The mean droplet size and polydispersity index analyses (PDI) ($n=3$) were measured at 25°C by photon correlation spectroscopy (Zetasizer Nanoseries, Malvern Instruments, UK) after diluting the samples in ultrapure water (1:500). Zeta potential analyses (ZP) were measured using the same instrument after the dilution of the samples in 10 mM NaCl (1:500). The pH values of nanoemulsions were determined by immersing directly the electrode of a calibrate potentiometer (Model pH 21, Hanna Instruments, Brazil) in the formulations. Measures were performed at room temperature ($25 \pm 2^\circ\text{C}$) in triplicate.

2.4 Physical stability

2.4.1 Centrifugation test

For the centrifugation test 10 mL of formulations were submitted to three different rotation speeds: 1,000, 2,500 and 3,500 rpm (MTD Plus III) for 15 min at each speed (Gumiero & da Rocha, 2012). After this, nanoemulsions were analyzed for macroscopic changes and were classified according to the instability events in normal, slightly modified, modified and intensely modified.

2.4.2 Heating/Cooling cycle

The heating/cooling cycle was performed in order to evaluate the nanoemulsion stability at extreme temperature changes. This test consisted in submitting the samples at 40°C temperature in an air stove (Mecalor, Brazil) for 24 h and then at 4°C in refrigerator (Consul, Brazil) for another period of 24 h, thus completing six cycles (12 days) (Gumiero & da Rocha, 2012). Physicochemical characteristics (droplet size, polydispersity index, zeta potential and pH) were evaluated before and after heating/cooling cycle ($n=3$).

2.4.3 Thermal Stress

Thermal stress test was carried out according Gumiero and co-works, with some modifications (Gumiero & da Rocha, 2012). For this, the samples were placed in a thermostatic bath (Cientec, Brazil) and submitted to a range of temperature (from 50°C up to 80°C, increasing by 5°C intervals) for 30 min at each condition. Physicochemical characteristics (droplet size, polydispersity index, zeta potential and pH) were evaluated before and after thermal stress ($n=3$).

2.5 DPPH radical scavenging capacity estimation

In order to evaluate the antioxidant property of PSO nanoemulsions (NE PSOB), an aliquot of 0.5 mL of each sample, at final concentration of 0.1, 0.25 and 0.5 mg/mL, was mixed with 1.5 mL of DPPH reagent at room temperature, following the method described by Serpen and co-workers (Serpen, Capuano, Fogliano, & Gokmen, 2007), with minor modifications. After 30 min, the absorbance values were measured at 518 nm and expressed as percentage of scavenging capacity following equation described below (Blois, 1958; Brandwilliams, Cuvelier, & Berset, 1995) (Eq. 1). An ethanolic solution of PSO and nanoemulsions were used as a blank, while DPPH solution was used as a negative control. Moreover, ascorbic acid was used as antioxidant activity knowledge, for comparison purpose.

$$SC \% = 100 - \frac{(Abs - Abb) \times 100}{Abc} \quad (Eq. 1)$$

Where: SC %: Scavenging capacity in percentage; Abs: sample absorbance; Abb: blank absorbance; Abc: control absorbance.

2.6 Cytotoxicity assay in glioma C6 cells and astrocyte cells

Malignant glioma cells line (C6) and primary astrocyte cells were obtained from American Type Culture Collection (ATCC). The cells were grown and maintained in low-glucose DMEM containing 0.1 % Fungizone and 100 U/L penicillin/streptomycin and supplemented with 5 % or 10 % FBS. Cells were kept at 37 °C in a humidified atmosphere with 5 % CO₂ (da Silveira, et al., 2013).

After the cells reached 90% confluency, they were subjected to trypsinization and counted in a Neubauer chamber, after seeding 10.000 cells per well in 96-well plates. These plates were kept at 37°C in a humidified atmosphere of 5% CO₂ for 24 h and were further

treated with PSO dissolved in DMSO or nanoemulsion formulations (NE PSOB) at 30, 50 and 100 μ L. Cells treated with DMSO were used as controls. After 24 h and 48 h of treatment, cell viability was determined by MTT method as previously described, which evaluates the mitochondrial functionality (da Silveira, et al., 2013).

2.7 Statistical analyses

Formulations were prepared and analyzed in triplicate and the results were expressed as mean \pm standard deviation. GraphPad Prism, version 5 were used for the test *t* and analyses of variance (ANOVA) one way followed by post-hoc Tukey's tests. Values of $p < 0.05$ were considered to be statistically significant.

3. Results and discussion

3.1 Preparation and characterization

PSO nanoemulsions were prepared by spontaneous emulsification method, using two different concentrations of PSO, 1.5 and 3.0 % (w/v). After preparation, the formulations had milky appearance, characteristic of colloidal systems. Solans and Solé reported that for obtaining nanodroplets with this method is necessary a very high solvent/oil ratio (Conxita Solans & Sole, 2012). In this study, it was used equal volumes of water and acetone, 50 mL for each phase. It was done in order to facilitate PSO solubilization and the formation of the droplets.

Table 1 shows the values of average diameter of the droplets, PDI, zeta potential and pH. By comparing both formulations, it is possible to notice a slight increasing trend in the characteristics with the increase of the oil concentration; however, there is no significant difference among the parameters evaluated. Droplet sizes were below 250 nm, which is compatible with other studies using the same method of preparation (Martini, Carvalho,

Teixeira, & de Oliveira, 2007). PDI was less than 0.2, indicating a homogeneous system. According to the literature, a narrow size distribution prevents Ostwald ripening and, for this reason, is related to a high stability of nanoemulsions (Yilmaz & Borchert, 2005). Zeta potentials were negative and pH values were in the acid range. These characteristics were probably influenced by the fatty acids of PSO and the presence of Tween 80[®] at droplet surface.

3.2 Physical stability

After preparation nanoemulsions were submitted to the centrifugation test, which allows fast information about instability phenomena like creaming, sedimentation, and phase separation. The formulation containing 0.15 g of PSO (NE PSOA) remained the initial characteristics, and no instability phenomena were observed. On the other hand, the formulation containing 0.30 g of PSO (NE PSOB) showed a moderate creaming above 2,500 rpm. This phenomenon can be reversed by stirring, which not avoid the use of the formulation.

PSO nanoemulsions were also submitted to thermal stress and heating/cooling cycle tests in order to analyze the influence of temperature changes on the stability of the formulations (Fig.1 and 2). Over the studies, no macroscopic modifications were observed, suggesting absence of instability phenomena. However, among the physicochemical parameters analyzed, only zeta potential was affected by higher temperatures. Regarding heating/cooling cycle study, no significant differences in the characteristics of the formulations were observed. The droplet size, PDI, zeta potential and pH values after thermal stress and heating/cooling cycle tests remained in the ranges 185 to 250 nm, 0.096 to 0.163, -17.39 to -22.47 mV and 4.39 to 4.89, respectively.

Temperature modifications can promote changes in the viscosity of the phases and can modify the interfacial tension inducing phase separation, creaming or coalescence. Gumiero and Rocha Filho described the physical and chemical stability of babassu nanoemulsions and reported that these systems also showed no difference in their characteristics when the formulations were submitted to changes of storage temperature (Gumiero & da Rocha, 2012).

3.3 DPPH radical scavenging capacity estimation

Since divers studies have proven that the antiproliferative activity of many natural compounds is related to its antioxidant ability, it was considered relevant to investigate whether nanoemulsification of PSO could interfere in this activity. Considering that NE PSOB showed adequate physico-chemical characteristics and has the higher PSO concentration, this formulation was selected for the *in vitro* evaluations.

The ability of PSO and NE to scavenge DPPH, a stable free radical, was evaluated in comparison with ascorbic acid, a standard antioxidant. Table 2 shows that radical scavenge activity of PSO was around 35%, regardless oil concentration ($p>0.05$). Liu and co-workers (Liu, Xu, Gong, He, & Gao, 2012) reported radical scavenging activity higher than 50% for PSO, however, the lowest concentration tested was 0.8 mg/mL, being 1.6 times higher than the maximum concentration evaluated in our work. Schubert and co-workers demonstrated that PSO has antioxidant activity higher than red wine, green tea and butylated hydroxyanisole (Schubert, Lansky, & Neeman, 1999). Shaban and co-workers showed that PSO presents low phenolic and flavonoid content (Shaban, El-Kersh, El-Rashidy, & Habashy, 2013), indicating that the antioxidant property is due, in addition to these compounds, to the presence of other substances as triterpenoids, gamma-tocopherol, 17-aestradiol, estrogens “estrone and estriol”, testosterone, b-sitosterol, coumesterol, campesterol, stigmasterol,

punicic acid and flavonoids “genistein and daidzein” (Kaufman & Wiesman, 2007; Lansky & Newman, 2007).

The comparison among PSO and NE showed no statistical difference between the radical scavenging activity of oil and nanoformulation, indicating that the nanoemulsification process did not affect the antioxidant activity of PSO.

3.4 Cytotoxicity assay in glioma rat cells (C6) and astrocyte cells

PSO and NE PSOB were assayed *in vitro* for their cell growth inhibitory activity in rat glioma C6 cells and astrocyte cells by the MTT assay. Figures 3A and 3B show that PSO reduced the viability of C6 cells, regardless of the dose tested. Moreover, no significant difference was observed among 24 and 48 h of experiment. In relation to the nanoemulsified formulation, NE PSOB also presented cytostatic action, decreasing C6 cells viability. After 24 h culture, significant suppression of 42 and 65% of growth occurred for the higher concentration (100 μ L) of NE PSOB and PSO, respectively. On the other hand, after 48 h culture, NE PSOB presented suppression of 53% of growth, whereas PSO kept the same cell viability.

PSO and its nanoemulsion showed excellent antiglioma potential with values more than 40% inhibition. For this, their selectivity was evaluated in astrocyte cultures as a non-transformed cell model. Figure 3C shows that NE PSOB did not promote significant alterations on astrocyte cell growth. Moreover, PSO presented significant reduction of astrocyte viability. These results suggest that PSO nanoemulsions are non-toxic to healthy cells, been selective for malignant cells.

PSO antitumor activity has been reported against other kinds of cells as MCF breast cancer (Kim, et al., 2002), colon, skin (Johanningsmeier & Harris, 2011) and DU 145 human prostate tumor (Albrecht, et al., 2004). The mechanisms involved in the reduction of tumors

growth are related to the presence of campesterol, stigmasterol, gamma-tocopherol and conjugated 18 carbon fatty acid, mainly punicic acid. They are capable of inhibiting lipid peroxidation and/or cyclooxygenase and lipoxygenase activity, hence, oxidative stress and inflammatory process, respectively, which can be involved in the apoptotic cascade (Johanningsmeier & Harris, 2011; Kim, et al., 2002). In addition, these compounds can inhibit the nuclear factor kappa B (NF- κ B) and can promote an antiangiogenic effect, related events which are related with the proliferation of tumor cells (Johanningsmeier & Harris, 2011).

Nanoemulsions represent a promising alternative for PSO administration in the prevention and treatment of glioma. Due to their colloidal size and aqueous continuous phase, PSO nanoemulsions can be administered by many routes, including intravenous.

4. Conclusions

The pomegranate seed oil nanoemulsions developed in this work combined adequate physicochemical characteristics with physical stability and antioxidant activity. The high antiglioma activity of PSO and its nanoemulsion suggest the potential use of the proposed formulation in the treatment of malignant glioma.

Acknowledgements

We thank C. B. da Silva for zetasizer access. L.M.F. thanks CAPES/Brazil for master fellowship.

5. References

Albrecht, M., Jiang, W. G., Kumi-Diaka, J., Lansky, E. P., Gommersall, L. M., Patel, A., Mansel, R. E., Neeman, I., Geldof, A. A., & Campbell, M. J. (2004). Pomegranate extracts potently suppress proliferation, xenograft growth, and invasion of human prostate cancer cells. *Journal of Medicinal Food*, 7(3), 274-283.

- Aslam, M. N. N., Lansky, E. P., & Varani, J. (2006). Pomegranate as a cosmeceutical source: Pomegranate fractions promote proliferation and procollagen synthesis and inhibit matrix metalloproteinase-1 production in human skin cells. *Journal of Ethnopharmacology*, *103*(3), 311-318.
- Behin, A., Hoang-Xuan, K., Carpentier, A. F., & Delattre, J. Y. (2003). Primary brain tumours in adults. *Lancet*, *361*(9354), 323-331.
- Blois, M. S. (1958). ANTIOXIDANT DETERMINATIONS BY THE USE OF A STABLE FREE RADICAL. *Nature*, *181*(4617), 1199-1200.
- Bouchemal, K., Briancon, S., Perrier, E., & Fessi, H. (2004). Nano-emulsion formulation using spontaneous emulsification: solvent, oil and surfactant optimisation. *International Journal of Pharmaceutics*, *280*(1-2), 241-251.
- Brandwilliams, W., Cuvelier, M. E., & Berset, C. (1995). USE OF A FREE-RADICAL METHOD TO EVALUATE ANTIOXIDANT ACTIVITY. *Food Science and Technology-Lebensmittel-Wissenschaft & Technologie*, *28*(1), 25-30.
- da Silveira, E. F., Chassot, J. M., Teixeira, F. C., Azambuja, J. H., Debom, G., Beira, F. T., Del Pino, F. A. B., Lourenco, A., Horn, A. P., Cruz, L., Spanevello, R. M., & Braganhol, E. (2013). Ketoprofen-loaded polymeric nanocapsules selectively inhibit cancer cell growth in vitro and in preclinical model of glioblastoma multiforme. *Investigational New Drugs*, *31*(6), 1424-1435.
- Gumiero, V. C., & da Rocha, P. A. (2012). Babassu Nanoemulsions Have Physical and Chemical Stability. *Journal of Dispersion Science and Technology*, *33*(11), 1569-1573.
- Johanningsmeier, S. D., & Harris, G. K. (2011). Pomegranate as a Functional Food and Nutraceutical Source. *Annual Review of Food Science and Technology*, *Vol 2*, *2*, 181-201.
- Kaufman, M., & Wiesman, Z. (2007). Pomegranate oil analysis with emphasis on MALDI-TOF/MS triacylglycerol fingerprinting. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *55*(25), 10405-10413.
- Kim, N. D., Mehta, R., Yu, W. P., Neeman, I., Livney, T., Amichay, A., Poirier, D., Nicholls, P., Kirby, A., Jiang, W. G., Mansel, R., Ramachandran, C., Rabi, T., Kaplan, B., & Lansky, E. (2002). Chemopreventive and adjuvant therapeutic potential of pomegranate (*Punica granatum*) for human breast cancer. *Breast Cancer Research and Treatment*, *71*(3), 203-217.

- Lansky, E. P., & Newman, R. A. (2007). Punica granatum (pomegranate) and its potential for prevention and treatment of inflammation and cancer. *Journal of Ethnopharmacology*, *109*(2), 177-206.
- Liu, G., Xu, X., Gong, Y., He, L., & Gao, Y. (2012). Effects of supercritical CO₂ extraction parameters on chemical composition and free radical-scavenging activity of pomegranate (*Punica granatum* L.) seed oil. *Food and Bioproducts Processing*, *90*(C3), 573-578.
- Martini, E., Carvalho, E., Teixeira, H., & de Oliveira, M. C. (2007). Oligonucleotide adsorption on nanoemulsions obtained by spontaneous emulsification. *Quimica Nova*, *30*(4), 930-934.
- Mirmiran, P., Fazeli, M. R., Asghari, G., Shafiee, A., & Azizi, F. (2010). Effect of pomegranate seed oil on hyperlipidaemic subjects: a double-blind placebo-controlled clinical trial. *British Journal of Nutrition*, *104*(3), 402-406.
- Poulsen, H. E., Prieme, H., & Loft, S. (1998). Role of oxidative DNA damage in cancer initiation and promotion. *European Journal of Cancer Prevention*, *7*(1), 9-16.
- Schubert, S. Y., Lansky, E. P., & Neeman, I. (1999). Antioxidant and eicosanoid enzyme inhibition properties of pomegranate seed oil and fermented juice flavonoids. *Journal of Ethnopharmacology*, *66*(1), 11-17.
- Serpen, A., Capuano, E., Fogliano, V., & Gokmen, V. (2007). A new procedure to measure the antioxidant activity of insoluble food components. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *55*(19), 7676-7681.
- Shaban, N. Z., El-Kersh, M. A. L., El-Rashidy, F. H., & Habashy, N. H. (2013). Protective role of Punica granatum (pomegranate) peel and seed oil extracts on diethylnitrosamine and phenobarbital-induced hepatic injury in male rats. *Food Chemistry*, *141*(3), 1587-1596.
- Solans, C., Izquierdo, P., Nolla, J., Azemar, N., & Garcia-Celma, M. J. (2005). Nano-emulsions. *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, *10*(3-4), 102-110.
- Solans, C., & Sole, I. (2012). Nano-emulsions: Formation by low-energy methods. *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, *17*(5), 246-254.
- Syed, D. N., Afaq, F., & Mukhtar, H. (2007). Pomegranate derived products for cancer chemoprevention. *Seminars in Cancer Biology*, *17*(5), 377-385.

Yilmaz, E., & Borchert, H. H. (2005). Design of a phytosphingosine-containing, positively-charged nanoemulsion as a colloidal carrier system for dermal application of ceramides. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 60(1), 91-98.

Table 1. Characteristics of pomegranate seed oil nanoemulsions

Analysis	NE POSA	NE PSOB
Mean diameter (nm)	219 ± 29	250 ± 43
PDI	0.10 ± 0.03	0.16 ± 0.08
Zeta potential (mV)	-23.20 ± 3.74	-20.10 ± 4.16
pH	4.5 ± 0.03	4.7 ± 0.17

NE POSA: nanoemulsions containing 1.5 % of PSO

NE PSOB: nanoemulsions containing 3.0 % of PSO

Table 2. DPPH radical scavenging capacity estimation of pomegranate seed oil and nanoemulsion

Concentrations (mg/mL)	Ascorbic acid (%)	PSO (%)	NE PSOB (%)
0.10	97.34 ± 0.35	27.51 ± 2.05	27.80 ± 2.58
0.25	97.15 ± 0.35	35.76 ± 3.37	28.47 ± 4.50
0.50	97.25 ± 0.06	37.89 ± 1.47	32.59 ± 9.87

PSO: pomegranate seed oil

NE PSOB: nanoemulsions containing 3.0 % of PSO

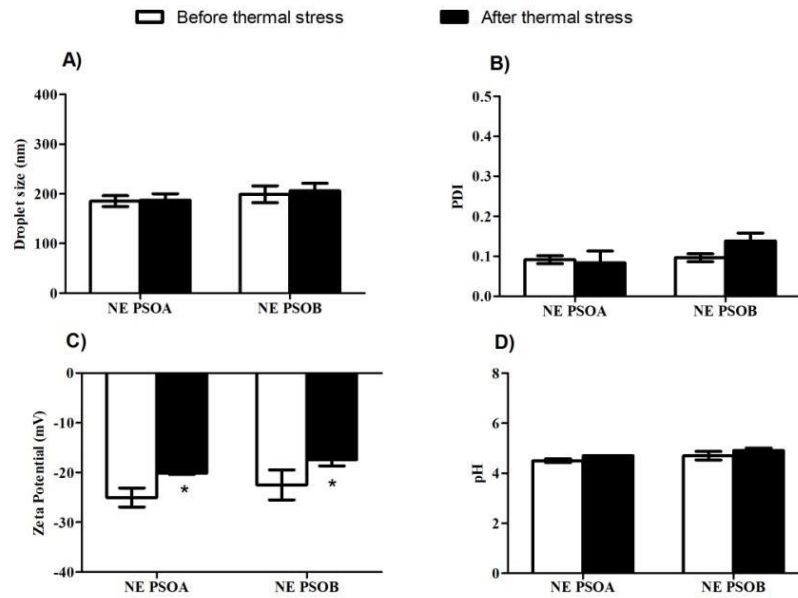


Figure 1. Results of thermal stress experiments: A) droplet size (nm); B) Polydispersity index; C) Zeta potential (mV); and D) pH. The symbol * indicate $p < 0.05$ significant difference between analyses before and after thermal stress. NE PSOA means: nanoemulsions containing 1.5 % of PSO; NE PSOB means: nanoemulsions containing 3.0 % of PSO

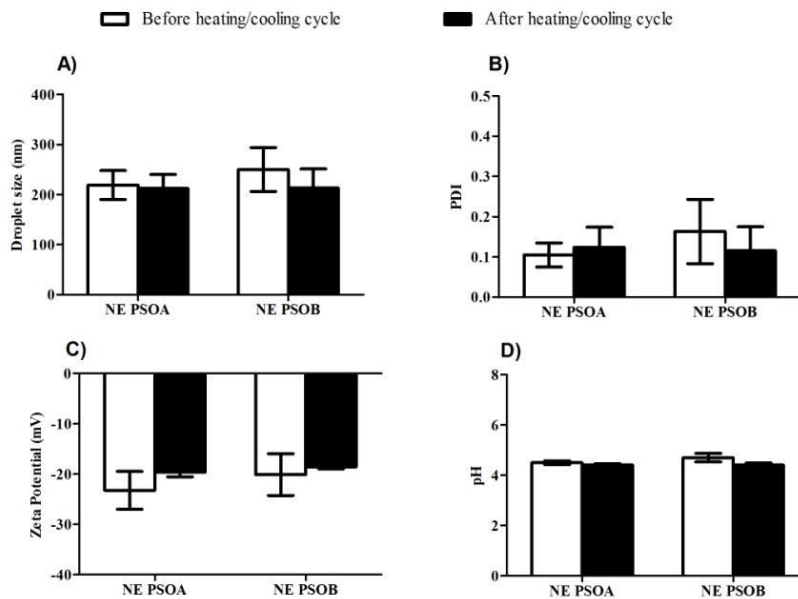


Figure 2. Results of heating/cooling cycle: A) droplet size (nm); B) Polydispersity index; C) Zeta potential (mV); and D) pH analyses. NE PSOA means: nanoemulsions containing 1.5 % of PSO; NE PSOB means: nanoemulsions containing 3.0 % of PSO.

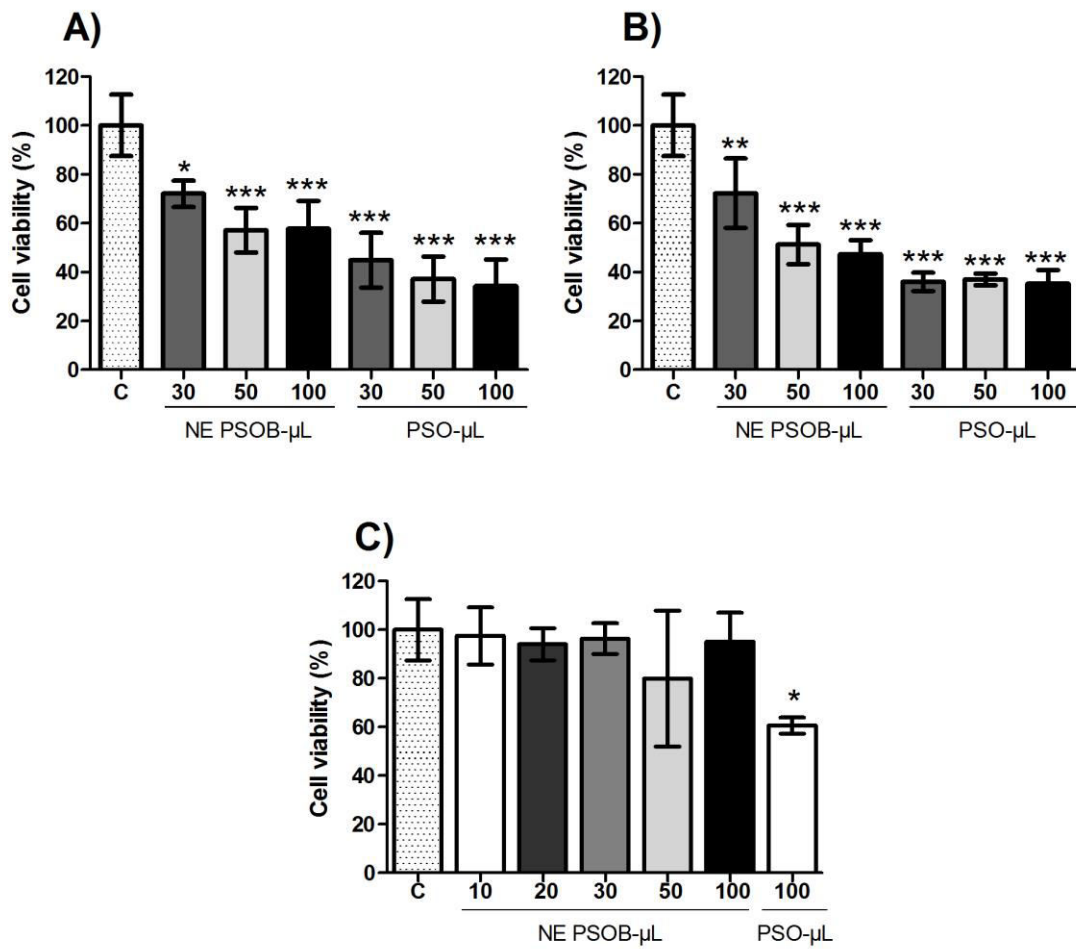


Figure 3. Results of cytotoxicity assay in glioblastoma cells (C6): A) Glioblastoma cells viability at 24 h; B) Glioblastoma cells viability at 48 h; C) Primary astrocyte cells viability. Levels of significant difference was indicated by asterisks (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$).

PUBLICAÇÃO 2: Improvement of antinociceptive effect of ketoprofen through its association with pomegranate seed oil in nanoemulsions

Artigo a ser submetido ao periódico International Journal of Pharmaceutics

Improvement of antinociceptive effect of ketoprofen through its association with pomegranate seed oil in nanoemulsions

Luana Mota Ferreira^a, Verônica Ferrari Cervi^a, Mailine Gehrcke^a, Marcel Henrique Marcondes Sari^b, Vanessa Angonesi Zborowski^b, Cristina Wayne Nogueira^b, Letícia Cruz^a.

^aPrograma de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS, Brasil

^bPrograma de Pós-graduação em Bioquímica Toxicológica, Centro de Ciências Naturais e Exatas, Universidade Federal de Santa Maria, RS, Brasil

Abstract

The combination of pomegranate seed oil and ketoprofen in nanoemulsions to improve antinociceptive effect was evaluated in the writhing test of mice. First of all, nanoemulsions with two different oil concentrations were developed, and these formulations showed adequate characteristics and were stable against mechanical stress and temperature changes. The nanoemulsions were able to increase ketoprofen photostability against UVC radiation during 3 h of exposure. Besides, nanoemulsions promoted total release of ketoprofen at 5 h. Moreover, time- and dose-response curves were obtained by acetic acid induced writhing in order to determine the antinociceptive effect of formulations. In the post test, nanoemulsion containing ketoprofen significantly ameliorated abdominal constrictions in time-response curve. Free ketoprofen showed antinociceptive effect up to 3 h, while ketoprofen-loaded nanoemulsions showed effect up to 12 h. In addition, blank nanoemulsion presented reduction of abdominal constriction up to 1 h of pre-treatment. In terms of dose-response curve, free ketoprofen present effect at 0,5 mg/Kg dose and nanoemulsion at 1,0 mg/Kg dose. Non-specific effects were discarded by spontaneous locomotors activity.

Keywords: Nanoemulsions; pomegranate seed oil; ketoprofen; antinociceptive effect; time- and dose-response curve.

1. Introduction

Pain and inflammation are complex and multifactorial processes that exert a pivotal role in the physiological homeostasis. The first acts as a warning system, emphasizing the presence of the potential danger, and the second is related with cellular and molecular events aiming reach the tissue repair (Woolf and Salter, 2000). The detection of noxious stimuli (excessive heat or cold, chemical and mechanical stimulus) originated from the periphery, occurs through activation of free nerve endings of myelinated sensory afferents little or no myelinated (A δ and C, respectively), named nociceptors (Almeida et al., 2004). Although their protective character, in some situations both processes could become dangerous and, as a consequence, triggering injuries, as observed in chronic inflammatory disease, where occur the peripheral sensitization (Basbaum et al., 2009). The sensitization of nociceptors is usually a result of the inflammatory process associated with changes in the pattern of chemical mediators (Woolf and Salter, 2000). Consequently, tissue injury is commonly linked to the accumulation of endogenous mediators released from activated nociceptors or non-neuronal cells residing or infiltrated in the injured area, such as macrophages and neutrophils (Schaible et al., 2010).

The search for therapeutic alternatives for pain and inflammation management, especially in chronic conditions, is extremely important. In this sense, the study proposes a novel association between pomegranate seed oil (PSO) and ketoprofen (KP). In recent years, PSO has attracted interest of researchers due to its composition rich in conjugated fatty acids, polyphenols and estrogen compounds, which give this oil anti-inflammatory, antioxidant and antitumor properties (Lansky and Newman, 2007; Schubert et al., 1999; Syed et al., 2007). Its anti-inflammatory activity is based on the inhibition of the lipoxygenase (LOX) and cyclooxygenase (COX) enzymes, mainly due to the presence of the punic acid and polyphenol compounds (Lansky and Newman, 2007; Schubert et al., 1999). On the other hand, ketoprofen (KP) is a non-steroid anti-inflammatory drug (NSAID) belonging to the class of the propanoic acid and presents analgesic, anti-inflammatory and antirheumatic activities due to its ability to inhibit COX action with consequent reduction of the prostaglandin production (Grecu et al., 2014). In order to make possible the association between KP and PSO in a pharmaceutical dosage form we proposed here the development of nanoemulsions, taking into account the possible advantages conferred by this type of nanostructured delivery system.

Nanoemulsions (NEs) are considered kinetically stable systems and present advantages compared to conventional emulsions, especially due to their small droplet size. These systems can promote modified drug release, increased gastrointestinal distribution (Koroleva and Yurtov, 2012), and drug protection against chemical and enzymatic degradation (Almeida et al., 2009). Besides, instabilities phenomena as sedimentation, creaming, flocculation and coalescence are prevented (Solans et al., 2005; Tadros et al., 2004). The choice of the oil phase is extremely important because the properties of the oil can affect the NE droplet size (Bouchemal et al., 2004). Such vegetable oils like soybean oil (Santos-Magalhaes et al., 2000), grape seed (Almeida et al., 2010) and castor oil (Araujo et al., 2011) have been used to prepare NEs. In general, vegetable oils are rich in substances which absorb radiation in the ultraviolet region and are promising materials to stabilize photolabile drugs (Afaq, 2011; Bhalekar et al., 2008).

In this context, the aim of this work was to develop PSO-based NEs containing KP. Formulations were evaluated for their physical stability and photostability. Moreover, NEs were tested in an animal pain model in order to evaluate their antinociceptive effect.

2. Materials and methods

2.1 Materials

KP was obtained from Henrifarma (São Paulo, Brazil). PSO was purchased from Via Farma (São Paulo, Brazil). Span 80[®] (sorbitan monooleate) was acquired from Sigma Aldrich (São Paulo, Brazil) and Tween 80[®] (polysorbate 80) was purchased from Delaware (Porto Alegre, Brazil). HPLC-grade methanol was acquired from Tedia (Rio de Janeiro, Brazil). Ultrapure water was obtained from Milli-Q[®] Plus apparatus. All other solvents and reagents were of analytical grade and used as received.

2.2 Methods

2.2.1 Analytical procedure

The experiments were performed on a LC-10A HPLC system (Shimadzu, Japan) equipped with a model LC-20AT pump, an UV-VIS SPD-M20A detector, a CBM-20A system controller and a SIL-20A HT valve sample automatic injector. Separation was achieved at room temperature using a Gemini C₁₈Phenomenex column (150 mm x 4.60 mm, 5 µm; 110 Å) coupled to a C₁₈ guard column. The isocratic mobile phase consisted

of methanol and water pH 3.0 (70:30 v/v) at 1 mL/min flow rate. KP was detected at 254 nm. According to the ICH guidelines, the method was validated for determination of KP in nanoemulsions. The method was found to be linear ($r=0.9985$), specific, accurate (103.08 to 106.12%) and precise (relative standard deviation = 1.54 %) in the concentration range of 3.0-15.0 $\mu\text{g/mL}$.

2.2.2 Determination of oil solubility of ketoprofen

To evaluate the solubility of KP in PSO, an excess of the drug was added to 1 mL PSO in sealed vials ($n=3$). The vials were submitted to a vortex mixer for 5 min and kept for 30 min in a sonicator. After this, the samples were centrifuged at 3,615 $\times g$ for 10 min, and an aliquot of the supernatant was diluted with methanol. KP content was determined by HPLC method described above.

2.2.3 Preparation and characterization of nanoemulsions

PSO NEs ($n=3$) containing KP were prepared by spontaneous emulsification method (Bouchemal et al., 2004). Briefly, an oil phase containing PSO (1.5% w/v or 3.0% w/v), Span 80[®] (0.077 g) and KP (0.01 g) was solubilized in acetone (50 mL) and mixed with a Tween 80[®] (0.077 g) aqueous phase (50 mL). The magnetic stirring was kept for 10 min and then the organic solvent was eliminated by evaporation under reduced pressure to achieve 10 mL final volume and 1mg/mL KP concentration. NEs prepared at 1.5% and 3.0% of PSO were named NE PSOA KP and NE PSOB KP, respectively, and formulations were prepared by protected from the light. For comparison purposes blank NEs were prepared (NE PSOA B and NE PSOB B).

Mean droplet sizes and polydispersity indexes (PDI) ($n=3$) were measured at 25°C by photon correlation spectroscopy (Zetasizer Nanoseries, Malvern Instruments, UK) after diluting the samples in ultrapure water (1:500). Zeta potential analyses (ZP) were performed using the same instrument after the dilution of the samples in 10 mM NaCl (1:500). pH values of NEs were determined by directly immersing the electrode of a calibrate potentiometer (Model pH 21, Hanna Instruments, Brazil) in the formulations. Measures were performed at room temperature ($25 \pm 2^\circ\text{C}$) in triplicate.

The total KP content in NEs ($n=3$) was determined by diluting 90 μL of the sample in 10 mL methanol and subjected it to sonication for 30 min. Samples were filtered through a 45 μm membrane and injected into the HPLC system. For the determination of encapsulation efficiency, an aliquot of the samples was placed in a

10,000 MW centrifugal device (Amicon[®] Ultra, Millipore) and free drug was separated from the nanostructures by ultrafiltration/centrifugation technique at 2,200 xg for 10 min. The ultrafiltrate was diluted 30 times and analyzed by HPLC method. The difference between the total and the free concentrations of KP, determined in the NEs and in the ultrafiltrate, respectively, was calculated as the encapsulation efficiency (EE%) of the NEs according to the following equation:

Eq (1)

$$EE = \frac{\text{Total content} - \text{Free content}}{\text{Total content}} \times 100$$

2.2.4 Physical stability

To evaluate the influence of the mechanical stress on the NEs stability, 10 mL formulations ($n=3$) were submitted to three different rotation speeds: 1,000, 2,500 and 3,500 rpm (MTD Plus III), at time of the 15 min at each speed (Gumiero & da Rocha, 2012). After this, NEs were analyzed for macroscopic changes and classified according to the instability events in normal, slightly modified, modified and intensely modified. Moreover, the drug content was measured before and after centrifugation study.

The influence of the temperature was also observed. Thermal stress test was carried out according Gumiero and co-works, with some modifications (Gumiero & da Rocha, 2012). For thermal stress analysis, samples were placed in a thermostatic bath (Cientec - CT- 249) and submitted to a range of temperature (from 50°C up to 80°C, increasing by 5°C intervals) for 30 min at each condition. Physicochemical characteristics (droplet size, polydispersity index, zeta potential, pH and drug content) were evaluated before and after thermal stress ($n=3$).

2.2.5 Photostability study

The photostability study was carried out through exposing NEs (1 mg/mL) and the drug methanolic solution (1 mg/mL) to an ultraviolet radiation (Phillips TUV lamp–UVC long life, 30 W) in a mirrored chamber (1 m x 25 cm x 25 cm). Samples were placed individually in plastic cuvettes with covers and kept 14 cm of distance from the light source. At predetermined intervals, 90 µL aliquots were withdrawn and diluted in methanol to assay the drug concentration in each sample by HPLC. To discard the influence of other factors that was not the presence of UVC light in KP degradation,

cuvettes containing the samples, wrapped in aluminum foil, were also evaluated (dark controls). The experiment was performed in triplicate.

2.2.6 *In vitro* drug release experiment

KP *in vitro* release profiles from PSO NEs were performed by dialysis diffusion technique. The samples (NE PSOA KP and NE PSOB KP) were placed in a dialysis bag (MWCO 10,000, Spectra Por 7), and this system was immersed in 150 mL phosphate buffer pH 6.8 at 37°C and under continuous stirring at 50 rpm. At predetermined intervals, 1 mL aliquots of dissolution medium were withdrawn and replaced by the same volume of fresh medium, in order to maintain *sink* conditions. The experiment was carried out in triplicate and the percentage of drug released was determined using the HPLC conditions previously mentioned. In order to elucidate the mathematical behavior and the drug release mechanism, the experimental data was fitted to first order equation ($\ln C = \ln C_0 - kt$). In these equations, C is the amount of the drug released at time t , C_0 is the initial concentration of the drug, k is the kinetic rate constant. The fit of the experimental data to the models was performed using the Scientist 2.0 software (Micromath, USA).

2.2.7 *Animals*

Male adult Swiss mice (25–35g) were housed in plastic boxes at controlled room temperature ($22 \pm 2^\circ\text{C}$) with free access to food and water, under a 12h light/dark cycle with lights on at 7:00 a.m. The animals were acclimatized at the laboratory before testing and used only once throughout the experiments. Mice were used according to the guidelines of the Committee on Care and Use of Experimental Animal Resources, of the Federal University of Santa Maria, Brazil (protocol number 1686615), and the ethical guidelines for investigations of experimental nociception in conscious animals (Zimmermann, 1983). The number of animals and intensities of noxious stimuli used were the minimum necessary to demonstrate the consistent effects of drug treatments. At the end of the experimental procedure, mice were killed by cervical displacement.

2.2.8 General procedures

Animals were randomly assigned into different groups ($n= 6$ to $8/$ group). KP, that was dissolved in saline solution/ Tween 80[®] 1% and NE PSOB were administered by intragastric route (i.g) in a single administration and in a constant volume of 10 mL/kg of body weight. For comparison purposes, the nanoemulsion without ketoprofen was also tested as the same way.

In order to better elucidate the possible antinociceptive effect of NEs, as well as a comparative analyze with free KP, a dose- and time-response curves were performed. For this purpose, animals were treated with the NEs or KP at dose range of 0.1–10 mg/kg, and treatment time was chosen accordingly the time-response curve which was performed with NEs or KP at a dose of 10 mg/kg. The treatment time that showed the best antinociceptive effect was chosen for the curve-response experiment. The animals were subjected to the evaluation of locomotor and exploratory activities before test to avoid that any alteration in motor coordination could be misinterpreted as antinociception.

2.2.8.1 Evaluation of antinociceptive activity

The antinociceptive effect was evaluated by the acid acetic induced abdominal constrictions, a chemical visceral pain model. The animals received acetic acid (1.6%, 10 mL/Kg) intraperitoneally (i.p.) according to the procedures previously described, with some modifications (Correa et al., 1996; Nogueira et al., 2003). After the injection, mice were individually placed in separate cages, and the abdominal constrictions were counted cumulatively over a period of 20 min. A writhe is characterized by a wave of constriction of abdominal musculature followed by extension of the hind limbs. The antinociceptive activity is expressed by the total number of writhes observed during the test.

2.2.8.2 Evaluation of locomotor and exploratory activities

To discard non-specific effects of treatments, spontaneous locomotor activity of mice was performed in the locomotor activity monitor (LAM). LAM is a Plexiglas cage (45 x 45 x 45 cm) surrounded by a frame consisting of 32 photocells mounted on opposite walls (16 L x 16W, spaced 2 cm apart) that continuously tracks the animal movements. Thus, for this purpose, the animal was placed in the center of the apparatus and allowed to freely explore the arena during 4 min (Gai et al., 2014).

2.9 Statistical analyses

Formulations were prepared and analyzed in triplicate and the results were expressed as mean \pm standard deviation. GraphPad Prism, version 5 were used for the test *t*, analyses of variance (ANOVA) one and two way followed by post-hoc Tukey's and Newman–Keuls' test. Values of $p < 0.05$ were considered to be statistically significant.

3. Results and discussion

3.1 Preparation and physicochemical characterization of nanoemulsions

Initially, it was evaluated the solubility of KP in PSO. The HPLC analysis indicated that the drug is soluble in the oil, in the tested conditions. The result showed that 3.08 mg/mL of KP dissolved in the oil. This way, PSO was considered a suitable oil to prepare NEs containing KP. After this, NEs were prepared by spontaneous emulsification method, which is a common method to prepare NEs due to the easiness and low cost.

Table 1 presents the results of the physicochemical characterization. The results show that there was a tendency of increasing in the droplet size in higher oil concentration, but no significant difference was found ($p < 0.05$). This could be explained by an increase in oil phase viscosity, which hinders the solvent diffusion and leads to the formation of larger droplets. Some authors reported that larger droplets are formed when more viscous oils are applied (Koroleva and Yurtov, 2012). On the other hand, it was already reported smaller droplets with the increase of oil phase viscosity (Bouchemal et al., 2004). The PDI values were less than 0.2 which indicate a homogeneous distribution of size. Regarding the literature, NEs obtained by emulsification method usually present droplet size below 200 nm with narrow size distribution (Saber et al., 2013).

Zeta potentials were negative and pH values were in the acid range, probably because of PSO constitution, which is rich in fatty acids. In addition, negative values of zeta potential could be a consequence of the presence of the oxygen atoms in the molecules of the polysorbate 80, which promotes a steric effect at interface droplet/water (Fontana et al., 2009). Drug contents were close to the theoretical value (1 mg/mL) and encapsulation efficiency was higher than 95%, which is due to the higher solubility of KP in the PSO. The concentration of PSO did not influence these parameters.

3.2 Physical stability studies

Accelerated stability tests as mechanical and thermal stress enable to predict instability phenomena in a minor time (Casagrande et al., 2009). In the mechanical test, the formulations presented a moderate creaming after 2,500 rpm, however, this instability phenomenon is considered reversible by agitation (Badolato et al., 2008). HPLC analysis showed that the formulations kept their drug content, showing no significant difference between the formulations ($p < 0.05$). In relation to thermal stress, figure 1 shows that droplet size, PDI, zeta potential and pH values presented no statistical difference by one-way ANOVA analysis ($p < 0.05$), regardless of the PSO concentration. However, for the formulation containing 1.5 % PSO there is a decrease in drug content, indicating that this formulation is less stable than the others.

3.3 Photostability study

Taking into account that KP is a photolabile drug (Mas et al., 2011) and NEs can improve the photostability of drugs (Almeida et al., 2009; Fontana et al., 2009), it was conducted a study in order to compare free KP with drug-loaded NEs. Samples were exposed to a drastic condition (UVC radiation) to reduce the time of the experiment. As can be seen in figure 2, KP methanolic solution presented a remaining content of 50.70% after 75 min of exposure. Moreover, both NEs reduced KP degradation since remaining contents were 65.86% and 78.66%, for NE PSOA KP and NE PSOB KP, respectively, after 180 min of exposure. The lower degradation observed for the formulations could be attributed to the confinement of the drug in the oil phase, as well as PSO constituents. There are some reports about prevention of oxidative events by PSO (Liu et al., 2012; Schubert et al., 1999), probably due to the presence of polyphenols and estrogens, which can promote an increase in photostability. Besides, the colloidal droplets, nanoemulsions could scatter the radiation, improving the photostability.

3.4 In vitro drug release profiles

In order to evaluate the ability of nanoemulsions to release ketoprofen, an *in vitro* experiment was carried out using dialysis bag. As can be seen in figure 3, the totality of the drug was released from NEs in 240 min of experiment. The oil concentration did not influence the release profiles ($p > 0.05$). Mathematical modeling

was used as an approach to elucidate the kinetics of drug release. The fit of the experimental data to first order equation indicated a higher correlation ($r>0.999$), meaning that KP release occurred in a single step. The kinetic rate constant (k) was 0.025 and 0.022 for NE PSOA KP and NE PSOB KP, respectively.

3.5 Antinociceptive effect

The acetic acid-induced abdominal constriction was used to evaluate the possible antinociceptive effect of NEs in comparison with free KP. Figure 4 shows time-response curves for the experimental groups. The results showed that for free KP (10 mg/kg, i.g.), antinociceptive action started at 30 min and remaining significant for up to 120 min ($p<0.05$), with a pick at 60 min of treatment (figure 4 A). On the other hand, for KP-loaded NE (10 mg/kg, i. g.) the effect started in 30 min and kept action up to 12 h ($p<0.05$), with a pick at 2 h (figure 4 B). Through test t analysis, it was possible to observe that blank NE also presented writhing reduction during 1 h of pretreatment ($p<0.05$), probably due to the anti-inflammatory property of PSO (Lansky and Newman, 2007; Schubert et al., 1999).

The KP administration 60 min earlier the test, at 0.5 mg/kg dose reduced significantly the number of writhes (figure 5 A) whereas KP-loaded NE administration 120 min earlier the test showed antinociceptive effect at a dose of 1 mg/kg (figure 5 B). Tables 2 and 3 show the parameters evaluated for spontaneous locomotor activity for NEs. One-way ANOVA analyzes showed no significant difference either to time and dose-response curves to NE and nor to free KP (*data not shown*), discarding non-specific effects.

In fact, acetic acid induced abdominal constriction is considered a conventional animal pain model for screening of substances that have analgesic and/or anti-inflammatory actions (Kaleem et al., 2013; Marcondes Sari et al., 2014). This test involves two analgesic stages: in the first one, nociception results from the direct stimulus of acetic acid injection, activating non selective cations channels located in the primary sensory pathway (Gao et al., 2013; Julius and Basbaum, 2001). Then, in the indirect way, it occurs production and release of endogenous mediators, causing an inflammatory nociception (Ribeiro et al., 2000). Therefore, the higher and prolonged antinociceptive effect of NEs can be attributed to the combination of KP and PSO, as well as to the properties of NE and the compounds present in PSO.

4. Conclusions

The study reported, for the first time, the association between ketoprofen and pomegranate seed oil in NEs. The formulations showed adequate physicochemical characteristics and an improvement in photostability and drug release *in vitro*. The NEs showed a prolonged profile of action in the nociception induced with acetic acid, when compared with the free KP. Therefore, the development of this formulation could be considered a promising alternative to treat chronic inflammatory and painful conditions, although further studies should be performed to better elucidate these results.

Acknowledgements

We thank CAPES for the financial support and C. B. Silva for the zetasizer access.

5. References

- Afaq, F., 2011. Natural agents: Cellular and molecular mechanisms of photoprotection. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 508, 144-151.
- Almeida, J.S., Jezur, L., Fontana, M.C., Paese, K., Silva, C.B., Pohlmann, A.R., Guterres, S.S., Beck, R.C.R., 2009. Oil-Based Nanoparticles Containing Alternative Vegetable Oils (Grape Seed Oil and Almond Kernel Oil): Preparation and Characterization. *Latin American Journal of Pharmacy* 28, 165-172.
- Almeida, J.S., Lima, F., Da Ros, S., Bulhoes, L.O.S., de Carvalho, L.M., Beck, R.C.R., 2010. Nanostructured Systems Containing Rutin: In Vitro Antioxidant Activity and Photostability Studies. *Nanoscale Research Letters* 5, 1603-1610.
- Almeida, T.F., Roizenblatt, S., Tufik, S., 2004. Afferent pain pathways: a neuroanatomical review. *Brain research* 1000, 40-56.
- Araujo, F.A., Kelmann, R.G., Araujo, B.V., Finatto, R.B., Teixeira, H.F., Koester, L.S., 2011. Development and characterization of parenteral nanoemulsions containing thalidomide. *European Journal of Pharmaceutical Sciences* 42, 238-245.
- Badolato, G.G., Aguilar, F., Schuchmann, H.P., Sobisch, T., Lerche, D., 2008. Evaluation of Long Term Stability of Model Emulsions by Multisample Analytical Centrifugation. *Surface and Interfacial Forces - from Fundamentals to Applications* 134, 66-73.
- Basbaum, A.I., Bautista, D.M., Scherrer, G., Julius, D., 2009. Cellular and Molecular Mechanisms of Pain. *Cell* 139, 267-284.

- Bhalekar, M.R., Harinarayana, D., Madgulkar, A.R., Pandya, S.J., Jain, D.K., 2008. Improvement of photostability in formulation: A review. *Asian Journal of Chemistry* 20, 5095-5108.
- Bouchemal, K., Briancon, S., Perrier, E., Fessi, H., 2004. Nano-emulsion formulation using spontaneous emulsification: solvent, oil and surfactant optimisation. *International Journal of Pharmaceutics* 280, 241-251.
- Casagrande, R., Baracat, M.M., Georgetti, S.R., Verri, W.A., Jr., Vicentini, F.T.M.C., Rafael, J.A., Jabor, J.R., Fonseca, M.J.V., 2009. Method validation and stability study of quercetin in topical emulsions. *Quimica Nova* 32, 1939-1942.
- Correa, C.R., Kyle, D.J., Chakraverty, S., Calixto, J.B., 1996. Antinociceptive profile of the pseudopeptide B-2 bradykinin receptor antagonist NPC 18688 in mice. *British Journal of Pharmacology* 117, 552-558.
- Cruz, L., Soares, L.U., Dalla Costa, T., Mezzalira, G., da Silveira, N.P., Guterres, S.S., Pohlmann, A.R., 2006. Diffusion and mathematical modeling of release profiles from nanocarriers. *International Journal of Pharmaceutics* 313, 198-205.
- Fontana, M.C., Coradini, K., Guterres, S.S., Pohlmann, A.R., Beck, R.C.R., 2009. Nanoencapsulation as a Way to Control the Release and to Increase the Photostability of Clobetasol Propionate: Influence of the Nanostructured System. *Journal of Biomedical Nanotechnology* 5, 254-263.
- Gai, B.M., Bortolatto, C.F., Bruening, C.A., Zborowski, V.A., Stein, A.L., Zeni, G., Nogueira, C.W., 2014. Depression-related behavior and mechanical allodynia are blocked by 3-(4-fluorophenylselenyl)-2,5-diphenylselenophene in a mouse model of neuropathic pain induced by partial sciatic nerve ligation. *Neuropharmacology* 79, 580-589.
- Gao, R., Ren, T., Feng, J., Wang, J., Weng, Y., Yang, R., Tang, X., 2013. Improvement in the efficacy of dexketoprofen by its prodrug in lipid emulsion. *European Journal of Lipid Science and Technology* 115, 153-160.
- Greco, M., Nastasa, V., Ilie, C., Miron, L., Mares, M., 2014. Comparative assessment of effectiveness of ketoprofen and ketoprofen/beta-cyclodextrin complex in two experimental models of inflammation in rats. *Laboratory Animals* 48, 20-26.
- Gumiero, V. C., & da Rocha, P. A., 2012. Babassu Nanoemulsions Have Physical and Chemical Stability. *Journal of Dispersion Science and Technology*, 33(11), 1569-1573.
- Julius, D., Basbaum, A.I., 2001. Molecular mechanisms of nociception. *Nature* 413, 203-210.

Kaleem, W.A., Muhammad, N., Qayum, M., Khan, H., Khan, A., Aliberti, L., De Feo, V., 2013. Antinociceptive activity of cyclopeptide alkaloids isolated from *Ziziphus oxyphylla* Edgew (Rhamnaceae). *Fitoterapia* 91, 154-158.

Koroleva, M.Y., Yurtov, E.V., 2012. Nanoemulsions: the properties, methods of preparation and promising applications. *Russian Chemical Reviews* 81, 21-43.

Korsmeyer, R.W., Gurny, R., Doelker, E., Buri, P., Peppas, N.A., 1983. Mechanisms of solute release from porous hydrophilic polymers. *International Journal of Pharmaceutics* 15, 25-35.

Lansky, E.P., Newman, R.A., 2007. *Punica granatum* (pomegranate) and its potential for prevention and treatment of inflammation and cancer. *Journal of Ethnopharmacology* 109, 177-206.

Liu, G., Xu, X., Gong, Y., He, L., Gao, Y., 2012. Effects of supercritical CO₂ extraction parameters on chemical composition and free radical-scavenging activity of pomegranate (*Punica granatum* L.) seed oil. *Food and Bioproducts Processing* 90, 573-578.

Marcondes Sari, M.H., Guerra Souza, A.C., Rosa, S.G., Souza, D., Dorneles Rodrigues, O.E., Nogueira, C.W., 2014. Contribution of dopaminergic and adenosinergic systems in the antinociceptive effect of p-chloro-selenosteroid. *Eur J Pharmacol* 725, 79-86.

Mas, S., Tauler, R., de Juan, A., 2011. Chromatographic and spectroscopic data fusion analysis for interpretation of photodegradation processes. *Journal of Chromatography A* 1218, 9260-9268.

Nogueira, C.W., Quinhones, E.B., Jung, E.A.C., Zeni, G., Rocha, J.B.T., 2003. Anti-inflammatory and antinociceptive activity of diphenyl diselenide. *Inflammation Research* 52, 56-63.

Ribeiro, R.A., Vale, M.L., Thomazzi, S.M., Paschoalato, A.B.P., Poole, S., Ferreira, S.H., Cunha, F.Q., 2000. Involvement of resident macrophages and mast cells in the writhing nociceptive response induced by zymosan and acetic acid in mice. *European Journal of Pharmacology* 387, 111-118.

Saberi, A.H., Fang, Y., McClements, D.J., 2013. Fabrication of vitamin E-enriched nanoemulsions: Factors affecting particle size using spontaneous emulsification. *Journal of Colloid and Interface Science* 391, 95-102.

Santos-Magalhaes, N.S., Pontes, A., Pereira, V.M.W., Caetano, M.N.P., 2000. Colloidal carriers for benzathine penicillin G: Nanoemulsions and nanocapsules. *International Journal of Pharmaceutics* 208, 71-80.

Schaible, H.G., von Banchet, G.S., Boettger, M.K., Braeuer, R., Gajda, M., Richter, F., Hensellek, S., Brenn, D., Natura, G., 2010. The role of proinflammatory cytokines in

the generation and maintenance of joint pain. *Neuroendocrine Immunology in Rheumatic Diseases: Translation from Basics to Clinics* 1193, 60-69.

Schubert, S.Y., Lansky, E.P., Neeman, I., 1999. Antioxidant and eicosanoid enzyme inhibition properties of pomegranate seed oil and fermented juice flavonoids. *Journal of Ethnopharmacology* 66, 11-17.

Solans, C., Izquierdo, P., Nolla, J., Azemar, N., Garcia-Celma, M.J., 2005. Nano-emulsions. *Current Opinion in Colloid & Interface Science* 10, 102-110.

Syed, D.N., Afaq, F., Mukhtar, H., 2007. Pomegranate derived products for cancer chemoprevention. *Seminars in Cancer Biology* 17, 377-385.

Tadros, T., Izquierdo, R., Esquena, J., Solans, C., 2004. Formation and stability of nano-emulsions. *Advances in Colloid and Interface Science* 108, 303-318.

Woolf, C.J., Salter, M.W., 2000. Neuroscience - Neuronal plasticity: Increasing the gain in pain. *Science* 288, 1765-1768.

Zimmermann, M., 1983. Ethical guidelines for investigations of experimental pain in conscious animals. *Pain* 16, 109-110.

Table 1. Physicochemical characteristics of nanoemulsions

	NE PSOA KP	NE PSOB KP
Drug content (%)	98.50 ± 0.18	98.11 ± 0.64
Mean diameter (nm)	183 ± 21	216 ± 15
PDI	0.10 ± 0.01	0.13 ± 0.03
Zeta potential (mV)	-17.10 ± 1.34	-15.90 ± 2.30
pH	5.0 ± 0.61	4.6 ± 0.30

NE PSOA KP: KP-loaded NE containing 1.5 % of PSO

NE PSOB KP: KP-loaded NE containing 3.0 % of PSO

Table 2. Results of spontaneous locomotor activity for nanoemulsions time-response curve.

Groups	NE PSOB B				NE PSOB KP			
	Crossing	Rearing	Distance (mm)	Velocity (mm/s)	Crossing	Rearing	Distance (mm)	Velocity (mm/s)
Control	445 ± 17	15.7 ± 0.8	7077 ± 257	34.67 ± 3.69	445 ± 17	15.7 ± 0.8	7077 ± 257	34.67 ± 3.66
0.5	400 ± 31	13.6 ± 0.7	7085 ± 511	31.33 ± 4.23	400 ± 34	13.2 ± 1.6	7630 ± 689	32.35 ± 2.91
1	448 ± 41	14.7 ± 0.7	8151 ± 342	33.88 ± 3.32	436 ± 52	17.4 ± 1.6	8195 ± 1320	34.98 ± 5.48
2	410 ± 37	16.3 ± 1.4	7650 ± 576	32.49 ± 2.37	481 ± 45	14.0 ± 0.9	7995 ± 404	34.54 ± 3.71
3	423 ± 48	14.4 ± 1.2	8319 ± 1101	37.10 ± 3.78	408 ± 30	13.8 ± 0.7	7345 ± 404	31.97 ± 1.43
4	459 ± 39	15.4 ± 1.1	7777 ± 575	35.77 ± 2.45	418 ± 38	16.1 ± 0.9	7538 ± 455	30.60 ± 2.85
6	450 ± 44	16.3 ± 1.6	7149 ± 455	38.61 ± 2.99	437 ± 48	17.0 ± 1.3	8188 ± 914	34.01 ± 4.10
8	398 ± 51	16.4 ± 2.1	7992 ± 1132	30.92 ± 2.92	461 ± 22	16.6 ± 1.8	7301 ± 622	36.77 ± 1.45
12	433 ± 37	13.8 ± 0.7	7591 ± 381	35.05 ± 2.66	467 ± 44	15.0 ± 1.1	7751 ± 381	36.52 ± 3.29
24	431 ± 19	16.8 ± 1.7	8102 ± 442	38.07 ± 3.59	384 ± 30	15.3 ± 1.5	7913 ± 802	38.89 ± 3.59

NE PSOB B: Blank nanoemulsions containing 3.0 % of PSO

NE PSOB KP: KP-loaded NE containing 3.0 % of PSO

Table 3. Results of spontaneous locomotor activity for nanoemulsions dose-response curve.

Groups	Crossing	Rearing	Distance (mm)	Velocity (mm/s)
Control	422 ± 20	13.40 ± 0.87	7574 ± 317	33.12 ± 1.19
NE PSOB B 5 mg/kg	462 ± 91	14.80 ± 0.73	7351 ± 650	30.26 ± 2.47
NE POSB KP 5 mg/kg	417 ± 48	12.07 ± 1.40	6983 ± 864	34.96 ± 2.46
NE POSB KP 1 mg/kg	461 ± 54	15.59 ± 1.61	6911 ± 834	36.86 ± 2.07
NE POSB KP 0.5 mg/kg	398 ± 47	15.00 ± 2.28	6801 ± 741	32.24 ± 3.49
NE POSB KP 0.1 mg/kg	377 ± 74	16.00 ± 4.24	6994 ± 1635	29.95 ± 2.91

NE PSOB B: Blank nanoemulsions containing 3.0 % of PSO

NE PSOB KP: KP-loaded NE containing 3.0 % of PSO

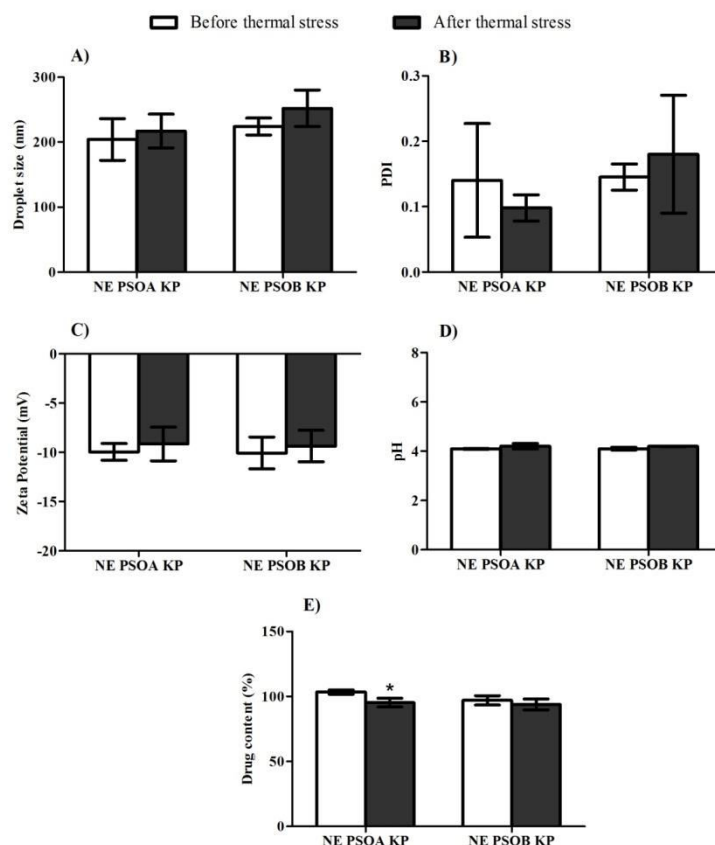


Figure 1. Physical stability: A) Droplet size (nm); B) PDI values; C) Zeta potential (mV); D) pH values; E) Drug content (%). Asterisks denote the significance levels (two-way ANOVA) (*) $p < 0.05$. NE PSOA KP means: KP-loaded nanoemulsion containing 1.5% of PSO; NE PSOB KP means: KP-loaded nanoemulsion containing 3.0% of PSO.

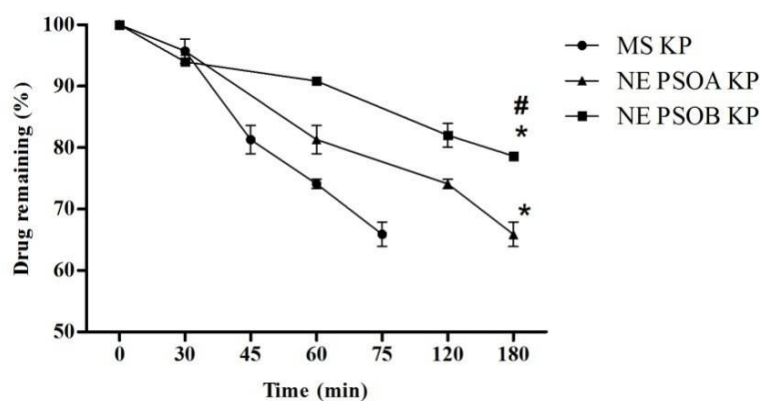


Figure 2. Photodegradation profiles of ketoprofen versus time. Asterisks denote significant difference when compared to the methanolic solution (MS KP) (*) $p < 0.05$. The sharp denotes the significant difference when compared to the NE PSOA KP (#) $p < 0.05$. NE PSOA KP means: KP-loaded nanoemulsion containing 1.5% of PSO; NE PSOB KP means: KP-loaded nanoemulsion containing 3.0% of PSO.

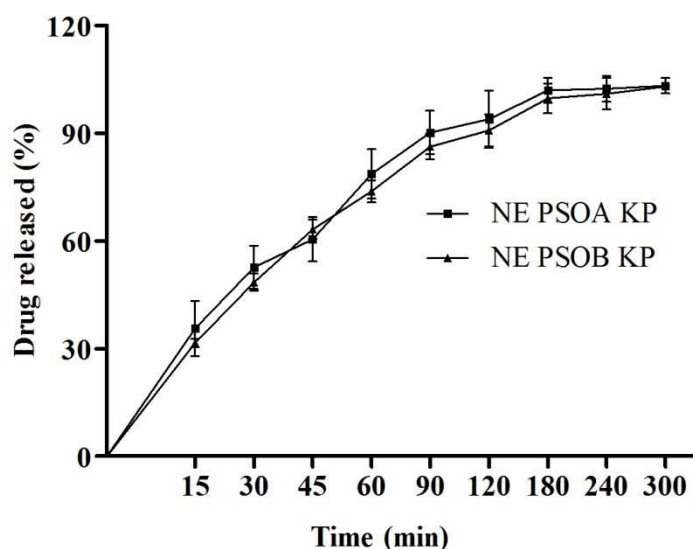


Figure 3. Ketoprofen release profiles from NEs and methanolic solution (MS KP). Asterisks denote significant difference (*) $p < 0.05$ analyzed by Two-way ANOVA. NE PSOA KP means: KP-loaded nanoemulsion containing 1.5% of PSO; NE PSOB KP means: KP-loaded nanoemulsion containing 3.0% of PSO.

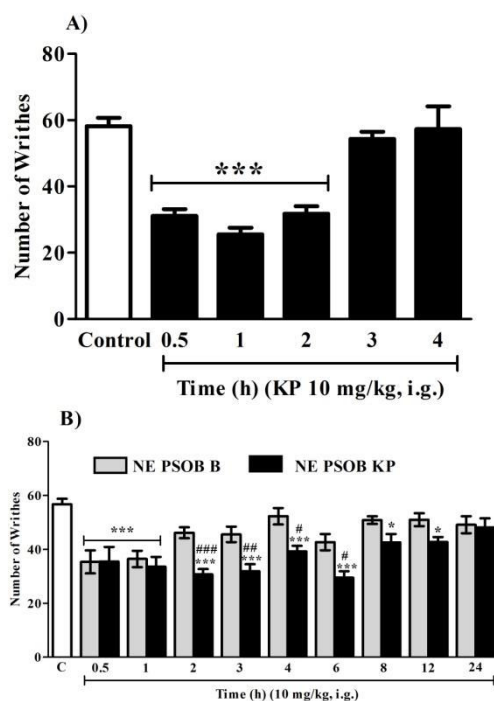


Figure 4. Effect of KP (10 mg/kg, i.g.) on acetic acid-induced writhing movements. (A) Time-response curve of free KP and (B) for nanoemulsions. Each column represents the mean with S.E.M. of 6–8 animals in each group. Asterisks denote the significance levels, when compared to the control group and sharp denotes significance levels comparing the formulations (analyzed by test t and one-way ANOVA followed by the Newman–Keuls test). NE PSOB KP means: KP-loaded nanoemulsion containing 3.0% of PSO; NE PSOB B means: blank nanoemulsions containing 3.0% of PSO.

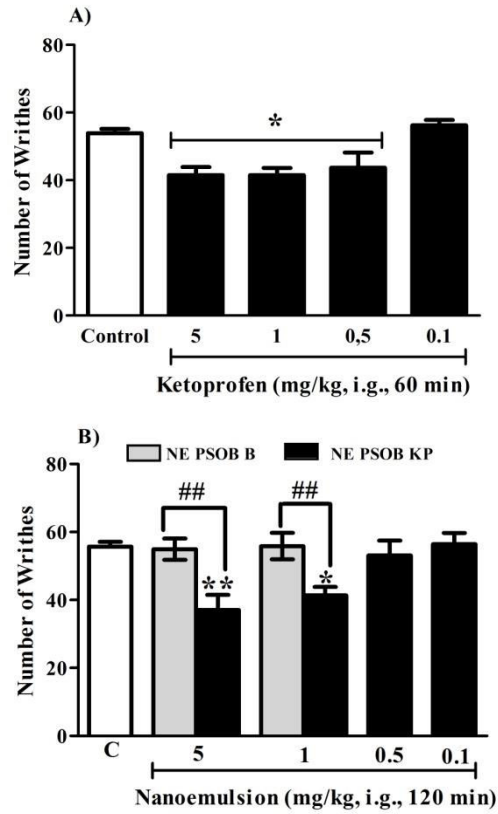


Figure 5. Effect of KP on acetic acid-induced writhing movements. (A) Dose-response curve of free KP and (B) for nanoemulsions. Each column represents the mean with S.E.M. of 6–8 animals in each group. Asterisks denote the significance levels, when compared to the control group and sharp denotes significance levels comparing the formulations (analyzed by test *t* and one-way ANOVA followed by the Newman–Keuls test). NE PSOB KP means: KP-loaded nanoemulsion containing 3.0% of PSO; NE PSOB B means: blank nanoemulsions containing 3.0% of PSO.

A nanotecnologia vem ganhando espaço no tratamento e prevenção de doenças complexas como as virais, tumorais e neurodegenerativas devido às inúmeras vantagens frente aos sistemas convencionais (WONG, WU, BENDAYAN, 2012; MEI et al, 2013; KAUR et al, 2014). Dentre estas características destacam-se o aumento da biodisponibilidade, com maior permeação pelas barreiras biológicas tais como a sangue-cérebro e a do trato gastrointestinal; redução de degradação química, enzimática e imunológica; prevenção do metabolismo de primeira passagem, controle da liberação pela escolha dos materiais e métodos de preparação, com consequente redução de dose e frequência de administração (KAUR et al, 2014). Os sistemas nanoestruturados mais relatados na literatura são os lipossomas, nanocristais, micelas, ciclodextrinas, nanopartículas poliméricas, nanopartículas lipídicas sólidas e as nanoemulsões (MARCATO, DURÁN, 2008; MATTHEOLABAKIS, CONSTANTINIDES, 2012; DIMER et al., 2013). O que determina a utilização de um ou outro é a via de administração, a complexidade da doença (invasividade, proliferação, sítio-alvo) e os problemas relacionados ao fármaco, principalmente em relação a permeabilidade e solubilidade.

Frente a alguns dos sistemas nanoestruturados citados, as nanoemulsões, nanocarreadores selecionados neste trabalho, podem apresentar vantagens importantes, tais como preparação rápida e de baixo custo e biocompatibilidade. Como primeira etapa do trabalho, objetivou-se o desenvolvimento de NEs de OR pelo método de emulsificação espontânea. Devido às diversas potencialidades deste sistema e inúmeros relatos na literatura que descrevem a aplicação de óleos vegetais, com atividades conhecidas, no tratamento e prevenção de doenças, tornou-se relevante a ideia de incorporar o OR a um sistema nanoestruturado. O método proposto para a preparação das NEs é considerado rápido, de baixo custo e de fácil transposição de escala, além de proporcionar gotículas com tamanho até 200 nm e com faixa de distribuição estreita (BOUCHEMAL et al, 2004; SOLANS et al, 2005; SABERI et al, 2013).

De acordo com a literatura, para a obtenção de gotículas pequenas por esse método é necessário uma maior taxa solvente/óleo, para facilitar a solubilização do óleo e, conseqüentemente, melhorar a difusão do solvente para o não-solvente (água) (SOLANS e SOLÉ, 2012). Portanto, para preparar as NEs foram utilizados 50 mL de acetona para solubilizar o OR. Além disso, a quantidade de óleo também pode influenciar no tamanho das gotículas, tendo em vista que este pode modificar a viscosidade da fase oleosa e com isso modificar a difusão do solvente e, assim,

umentar ou diminuir o tamanho das gotículas (BOUCHEMAL et al, 2004; SADURNÍ et al, 2005). Portanto, duas concentrações de óleo foram testadas: 1,5 e 3,0 %. Ambas as formulações apresentaram características físico-químicas adequadas, porém, a formulação com 3,0 % de OR apresentou uma tendência ao aumento de tamanho sem diferença significativa ($p>0,05$).

As NEs são consideradas cineticamente estáveis frente à floculação devido à estabilização estérica proporcionada pelos tensoativos. Além disso, devido ao tamanho reduzido são sistemas mais estáveis que as emulsões convencionais, reduzindo a presença de fenômenos como sedimentação, coalescência, cremagem e separação de fases (CAPEK, 2004; SOLANS e SOLÉ, 2005). Diante disso, avaliações da estabilidade de NEs são de extrema importância, uma vez que fornecem informações rápidas sobre as propriedades de estabilidade das formulações. Neste trabalho foram realizados testes de estresse físico e químico, através da centrifugação e estresse térmico. As formulações, independente da quantidade de óleo, mostraram-se com características adequadas após os experimentos, sem alterações significativas ($p<0,05$). Com o teste de centrifugação podemos avaliar fenômenos de cremagem, sedimentação e separação de fases em tempo menor de análise (BADOLATO et al, 2008). Além disso, mudanças na temperatura de armazenamento podem ocasionar diminuição da viscosidade da fase externa, favorecendo assim a coalescência e a cremagem (AULTON, 2005; CASAGRANDE et al, 2009).

Há relatos na literatura que o desenvolvimento de tumores está relacionado ao dano oxidativo causado às moléculas de DNA (POULSEN; PRIEME; LOFT, 1998; BIANCHI; ANTUNES, 1999). Dessa forma, foi avaliado neste trabalho, se o processo de nanoemulsificação afetaria a atividade antioxidante do OR, o que poderia levar a uma diminuição da atividade antitumoral. Vale ressaltar que este teste foi feito com fins comparativos, e para isso, foi utilizado o radical 1'1-difenil-2-picrilhidrazil (DPPH) como agente oxidante. Esta técnica foi originalmente desenvolvida por Blois (BLOIS, 1958) e adaptada por diversos autores. É baseada no princípio de que, na presença de um antioxidante doador de hidrogênio e em meio alcoólico, o DPPH é reduzido à difenil picrilhidrazina (KOLEVA et al, 2002). O grau de redução pode ser acompanhado espectrofotometricamente pela diminuição da absorbância, bem como pela mudança de coloração violeta para amarela. Com os resultados foi possível observar que a incorporação do OR em um sistema nanoestruturado não modificou sua ação antioxidante, sendo esta, na concentração de 0,5 mg/mL, em torno de 33% e 37%, para

a NE e para o OR livre, respectivamente. É importante mencionar que foi encontrado um estudo empregando a mesma técnica de avaliação da atividade antioxidante para o OR, a qual foi de 50 %. Entretanto, a concentração testada foi 1,6 vezes mais elevada do que as empregadas neste trabalho.

O glioma é um dos piores tipos de tumores cerebrais já estudados, devido à alta taxa de proliferação celular e invasividade em tecidos normais (BEHIN et al, 2003). A terapia é baseada em radio e/ou quimioterapia, contudo, estes agentes demonstram eficácia limitada, principalmente devido à quimiorresistência destes tumores, alta toxicidade e também pela baixa permeação através da barreira sangue-cérebro (MOUSSEAU et al, 1993). Dessa forma, torna-se relevante a busca por terapias alternativas que visem uma ação antitumoral específica para este tipo de neoplasia, reduzindo os efeitos colaterais e melhorando a eficácia terapêutica. Diante disso, foi realizado um estudo de atividade antitumoral das NEs frente a linhagens de glioma (C6). O resultado obtido é considerado excelente, tendo em vista o grau de proliferação celular do glioma, onde foi observada uma redução da viabilidade celular em torno de 50% após 48 h. Além disso, tanto a formulação, quanto o OR livre foram específicos, pois não reduziram a viabilidade das células normais testadas, os astrócitos.

A fim de explorar a atividade anti-inflamatória do OR, na segunda parte do trabalho foram desenvolvidas NEs pelo mesmo método de preparação, com a incorporação de um fármaco com tal atividade bem descrita. O fármaco empregado foi o CP, um potente inibidor da enzima COX, o qual reduz a síntese de mediadores inflamatórios, principalmente as prostaglandinas (ASHVINI et al., 2011). Além disso, também foi avaliada sua fotoestabilidade frente a radiação UVC.

Previamente à determinação do teor do CP nas NEs, foi realizada a validação do método analítico por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). O CP já foi estudado por nosso grupo de pesquisa (RIBAS, 2013), por isso, o método analítico já havia sido desenvolvido. Portanto, foram avaliados apenas os parâmetros de especificidade, linearidade, exatidão e precisão. A NE escolhida para realizar as análises foi a NE PSOB KP, tendo em vista que esta formulação apresenta a maior concentração de OR (3,0 %), garantindo assim que este método possa ser utilizado para o doseamento do fármaco também na NE PSOA KP.

O método mostrou-se específico para determinar o CP nas NEs. Comparando-se os cromatogramas, não foi observado nenhum pico no tempo de retenção do fármaco quando a NE branca foi injetada. Com isso, pode-se considerar que os componentes

presentes na formulação não interferem na determinação do fármaco. Outra análise importante é a linearidade, a qual representa a capacidade do método em fornecer resultados diretamente proporcionais à concentração da substância em estudo, dentro de uma determinada faixa específica, podendo ser representada com a curva analítica (ANVISA, 2003; RIBANI et al., 2004). O coeficiente de correlação (r) é o principal parâmetro utilizado para estimar a qualidade da curva analítica, tendo em vista que quanto mais próximo de 1,0, menor a dispersão do conjunto de dados experimentais e melhor o ajuste dos mesmos à linha de regressão. O método em questão apresentou coeficiente de correlação de $r=0,9985$, indicando linearidade.

A precisão é um parâmetro que representa a dispersão dos dados em ensaios independentes, geralmente repetidos de uma mesma amostra, sendo avaliada em relação à precisão intermediária e reprodutibilidade (RIBANI et al, 2004). Por outro lado, a exatidão avalia o grau de concordância dos dados com um valor de referência aceito como verdadeiro (RIBANI et al, 2004), e pode ser avaliada pelo método do placebo contaminado, onde uma alíquota de solução padrão é adicionada à uma formulação branca e esta mesma quantidade deve ser recuperada. O método proposto mostrou-se preciso e exato, com desvio padrão relativo abaixo de 5 %, índice recomendado pela ANVISA (ANVISA, 2003).

Nos estudos de pré-formulação foi determinada a solubilidade do CP no OR. Esta análise é muito importante e pode ser indicativa da localização do fármaco no sistema, ou seja, se ele vai estar ou não dissolvido na gotícula. Através dos resultados pode-se dizer que o OR é adequado para compor a fase oleosa deste sistema. Após a preparação, as NEs apresentaram características físico-químicas adequadas e nenhum dos parâmetros avaliados foi modificado pela incorporação do fármaco ($p<0,05$). O teor de CP foi próximo ao teórico e a eficiência de encapsulamento foi maior que 95%.

Levando em consideração que a presença de óleos vegetais em sistemas nanoestruturados pode aumentar a fotoestabilidade de fármacos fotolábeis (ALMEIDA et al, 2009), foi avaliada a influência da NE de OR na proteção do CP frente radiação ultravioleta C (UVC). As reações de fotodegradação na maioria dos casos são processos de oxidação associados à absorção de energia. Dessa forma, a radiação UVC foi escolhida por ser a mais energética e com isso apresentando-se como uma condição drástica de degradação. O teste de fotoestabilidade tem relevância uma vez que, fármacos sensíveis à luz podem sofrer alterações durante sua manipulação e armazenamento, podendo gerar radicais indesejados nas formulações ou tóxicos ao

organismo (ALBANI e FASANI, 1998). Os resultados mostraram que a presença do OR protegeu o fármaco da degradação, e que a quantidade de óleo influenciou no perfil de degradação, pois a formulação contendo maior quantidade de OR teve teor remanescente de cerca de 80%, enquanto que a menor quantidade de OR apresentou cerca de 65% de CP após a exposição. Essa proteção conferida pelo OR se deve provavelmente devido à presença de polifenóis e estrogênios em sua composição, moléculas capazes de absorver a luz e dessa forma proteger o fármaco da degradação (SCHUBERT et al, 1999; LIU et al, 2012).

A liberação *in vitro* do CP a partir das NEs foi avaliada pela técnica de difusão em sacos de diálise. Para padronizar o meio de liberação foram testadas três composições: tampão fosfato pH 6,8, água ácida pH 1,2 e água:etanol (70:30, v/v). Nas três condições não houve alterações no pico do fármaco quando analisado por CLAE. Na busca por uma condição que favorecesse as condições *sink* e tivesse maior semelhança com a condição *in vivo*, o meio escolhido para dar seguimento ao experimento foi tampão fosfato pH 6,8. Dessa forma, foi possível traçar os perfis de liberação do CP em função do tempo a partir das NEs. Com os resultados foi possível observar que a quantidade do OR não afetou o perfil de liberação do CP, onde 100% do fármaco foi liberado em 5 h de experimento. Além disso, em todos os casos, a modelagem matemática dos dados experimentais mostrou que a liberação do CP a partir das NEs segue cinética de primeira ordem, sem ocorrência de uma etapa abrupta de liberação (efeito *burst*). Este resultado corrobora a ideia de que o fármaco está totalmente dissolvido na gotícula de óleo.

Com o propósito de avaliar a eficácia da combinação do OR com o CP, o fármaco livre e formulação contendo 3,0% de OR foram testadas em modelo animal de dor. Para isso, o método de contorções induzidas pelo ácido acético foi escolhido. De acordo com Marcondes Sari e col. esse teste é adequado para o *screening* de substâncias com efeito antinociceptivo (MARCONDES SARI et al, 2014). A técnica baseia-se no estímulo nociceptivo causado pela ação direta da injeção do ácido acético e pela produção e liberação de mediadores inflamatórios, devido a mudança no pH no peritônio. Diante disso, a ação antinociceptiva pode ser atribuída a atividade anti-inflamatória do CP e do OR. Com os resultados apresentados é possível observar uma elevada eficácia na diminuição da nocicepção pela NE, quando comparada ao fármaco livre. Além disso, a NE branca também mostrou ter efeito antinociceptivo, o qual pode ser atribuído aos constituintes do OR, que conferem a este atividade anti-inflamatória. Porém, o efeito foi

mais pronunciado quando foi feita a associação dos dois. O efeito mais significativo da associação CP e OR pode ainda ser atribuído ao efeito, não só das vias inflamatórias, mas também pelo envolvimento do sistema adrenérgico da supra-espinhal, desempenhado pelo fármaco, como relatado por Pinardi e col (PINARDI; SIERRALTA; MIRANDA, 2001). Tartau e col. incorporaram o CP em lipossomas e mostraram atividade antinociceptiva pelo mesmo método. No entanto, o fármaco livre reduziu o número de contorções de forma mais acentuada que a formulação nas primeiras horas de experimento. Além disso, o efeito se prolongou até 5 horas de avaliação, em contraste com os resultados apresentados neste trabalho, onde o efeito se manteve até 12 horas (TARTAU; CAZACU; MELNIG, 2012). Por isso, pode-se sugerir uma potencialização do efeito terapêutico do fármaco e as atividades desempenhadas pelos constituintes presentes no óleo, sendo este sistema uma plataforma promissora para o tratamento de dores inflamatórias, principalmente em casos crônicos.

CONCLUSÕES

Como conclusões gerais pode-se dizer que o óleo de romã é uma matéria-prima promissora para a preparação de nanoemulsões. Pelas propriedades avaliadas neste trabalho, as nanoemulsões à base de óleo de romã podem ser consideradas uma plataforma promissora para tratamento de gliomas. Além disso, foi mostrado um sinergismo entre a associação do óleo e um fármaco anti-inflamatório com atividade já bem descrita, sendo este sistema capaz de reduzir os efeitos nociceptivos em animais. Dessa forma, através deste trabalho, foi obtido um sistema de fácil preparação com aplicação promissora na terapia antitumoral e no manejo da dor inflamatória.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBASI, H. et al. Effect of various extraction conditions on the phenolic contents of pomegranate seed oil. **European Journal of Lipid Science and Technology**, v. 110, p. 435 – 440, 2008.

AFAQ, F. Natural agents: Cellular and molecular mechanisms of photoprotection. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 508, p. 144 – 151, 2011.

AHANGARI, B., SARGOLZAEI, J. Extraction of pomegranate seed oil using subcritical propane and supercritical carbon dioxide. **Theoretical Foundations of Chemical Engineering**, v. 46, n. 3, p. 258 – 265, 2012.

ALAYOUBI, A et al. Concurrent delivery of tocotrienols and simvastatin by lipid nanoemulsions potentiates their antitumor activity against human mammary adenocarcinoma cells. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 48, p. 385 – 392, 2013

ALBINI, A., FASANI, E. Photochemistry of drugs: An overview and practical problems. Drug: **Photochemistry and Photostability**, 1998.

ALBRECHT et al. Pomegranate extracts potently suppress proliferation, xenograft growth, and invasion of human prostate cancer cells. **Journal of Medicinal Food**, v. 7, n. 3, p. 274 – 283, 2004.

ALMEIDA, T. F. et al. Afferent pain pathways: a neuroanatomical review. **Brain Res**, v. 1000, p. 40 – 56, 2004.

ALMEIDA, J. S. et al. Oil-Based Nanoparticles Containing Alternative Vegetable Oils (Grape Seed Oil and Almond Kernel Oil): Preparation and Characterization. **Latin American Journal of Pharmacy**, v. 28 (2), p. 165 – 172, 2009.

ALMEIDA, J. S. et al. Nanostructured systems containing rutin: in vitro antioxidant activity and photostability studies. **Nanoscale Research Letters**, v. 5, p. 1603 – 1610, 2010.

AMBRUS, R. et al. Investigation of preparation parameters to improve the dissolution of poorly water-soluble meloxicam. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 381, p. 153 – 159, 2009.

AMRI, A. et al. Resveratrol self-emulsifying system increases the uptake by endothelial cells and improves protection against oxidative stress-mediated death. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 86, p. 418 – 426, 2014.

ANARJAN, N. et al. Effect of processing conditions on physicochemical properties of astaxanthin nanodispersions. **Food Chemistry**, v. 123, p. 477 – 483, 2010.

ANARJAN, N. et al. Effect of processing conditions on physicochemical properties of astaxanthin nanodispersions. **Food Chemistry**, v. 123, p. 477 – 483, 2010.

ANTON, N.; BENOIT, J.; SAULNIER, P. Design and production of nanoparticles formulated from nano-emulsion templates – A review. **Journal of Controlled Release**, v. 128, p. 185 – 199, 2008.

ANVISA. Agencia Nacional de Vigilância Sanitária, RE 899, Brasil, 2003.

ARAÚJO, F. A. et al. Development and characterization of parenteral nanoemulsions containing thalidomide. **European Journal of Pharmaceutics Sciences**, v. 42, p. 238 – 245, 2011.

ASHVINI, U. V.; KAVITHA, K.; MEHABOOB, Y. Design and evaluation of ketoprofen loaded albumin microspheres. **International Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 2, n. 3, p. 910-924, 2011.

ASLAM, M. N.; LANSKY, E. P.; VARANI, J. Pomagranate as a cosmeceutical source: Pomagranate fractions promote proliferation and procollagen synthesis and inhibit matrix metalloproteinase-1 production in human skin cells. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 103, p. 311 – 318, 2006.

AULTON, M. E. **Delineamento de formas farmacêuticas**. Artmed: Porto Alegre, 2005.

BABOOTA, S., et al. Design, development and evaluation of novel nanoemulsion formulations for transdermal potential of celecoxib. **Acta Pharmaceutica**, v. 57, p. 315 – 332, 2007.

BADOLATO, G. G. et al. Evaluation of long term stability of model emulsions by multisample analytical centrifugation. **Progress in Colloidal and Polymer Science**, v. 134, p. 66-73, 2008.

BAE, D. et al. Effect of lecithin on dermal safety of nanoemulsion prepared from hydrogenated lecithin and silicone oil. **Bulletin of the Korean Chemical Society**, v. 30, n. 4, p. 821 – 824, 2009.

BASBAUM, A. I. et al. Cellular and molecular mechanisms of pain. **Cell**, v. 139, n. 2, p. 267-84, 2009.

BASPINAR, Y.; KECK, C.; BORCHERT, H. Development of a positively charged prednicarbate nanoemulsion. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 383, p. 201 – 208, 2010

BEHIN, A. et al. Primary brain tumors in adults. **Lancet**, v. 361, p. 323 – 331, 2003.

BEKIR, J. et al. Assessments of antioxidant, anti-inflammatory, anti-cholinesterase and cytotoxic activities of pomegranate (*Punica granatum*) leaves. **Food and Chemical Toxicology**, v. 55, p. 470 – 475, 2013.

BELHAJ, N.; ARAB-TEHRANY, E.; LINDER, M. Oxidative kinetics of salmon oil in bulk and in nanoemulsion stabilized by marine lecithin. **Process Biochemistry**, v. 45, p. 187 – 195, 2010.

BHALEKAR, M. R. et al. Improvement of photostability in formulation: A review. **Asian Journal of Chemistry**, v. 20, n 7, p. 5095 – 5108, 2008.

BIANCHI, M. L. P.; ANTUNES, L. M. G. Free radicals and the main dietary antioxidants. **Revista de Nutrição, Campinas**, v. 12, n. 2, p. 123 – 130, 1999.

BLOIS, M. S. Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. **Nature**, v. 181, p. 1199 – 1200, 1958.

BORNE, R. F. Nonsteroidal anti-inflammatory drugs. In: FOYE, W. O.; LEMKE, T. L.; WILLIAMNS, D. A. **Principles of Medicinal Chemistry**. Willians & Wilkins, 1998. 4. ed. p. 535-580.

BOUCHEMAL, K. et al. Nano-emulsions formulation using spontaneous emulsification: solvent, oil and surfactant optimisation. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 280, p. 241 – 251, 2004.

BOURDON, O. et al. A comparative study of the cellular uptake, localization and phototoxicity of *meta*-tetra (hydroxyphenyl) chlorin encapsulated in surface-modified submicron oil/water carriers in HT29 tumor cells. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 55, p. 164 – 171, 2000.

BOUYER, E. et al. Proteins, polysaccharides, and their complexes used as stabilizers of emulsions: Alternatives to synthetic surfactants in the pharmaceutical field? **International Journal of Pharmaceutis**, v. 436, p. 359 – 378, 2012.

BRUXEL, F. et al. Nanoemulsões como sistema de liberação parenteral de fármacos. **Química Nova**, v. 35, n 9, p. 1827 – 1840, 2012.

CAPEK, I. Degradation of kinetically-stable o/w emulsions. **Advances in Colloid and Interface Science**, v. 107, p. 125 – 155, 2004.

CASAGRANDE, R. et al. Method validation and stability study of quercetin in topical emulsions. **Química Nova**, v. 32, n. 7, p. 1939 – 1942, 2009.

CHOI, Y. et al. Titanium dioxide inclusion in backing reduce the photoallergenicity of ketoprofen transdermal patch. **Archives of Toxicology**, v. 85, p. 219 – 226, 2011.

CONSTANTINIDES, P. P.; CHAUBAL, M. V.; SHORR, R. Advances in lipid nanodispersions for parenteral drug delivery and targeting. **Advance Drug Delivery Reviews**, v. 60, p. 757 – 767, 2008.

COUVREUR, P., VAUTHIER, C. Nanotechnology: intelligent design to treat complex disease. **Pharmaceutical Research**, v. 23, p. 1417-1450, 2006.

COTRAN, R.S.; KUMAR, V.; COLLINS, T. **Patologia Estrutural e Funcional**. 7ª ed. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan, 2006.

DA SILVEIRA, E. F. et al. Ketoprofen-loaded polymeric nanocapsules selectively inhibit cancer cell growth in vitro and in preclinical model of glioblastoma multiforme. **Investigation of New Drugs**, v. 31, p. 1424 – 1435, 2013.

DESAI, A.; VYAS, T.; AMIJI, M. Cytotoxicity and apoptosis enhancement in brain tumor cells upon coadministration of paclitaxel and ceramide in nanoemulsion formulation. **Pharmaceutical Nanotechnology**, v. 97, p. 2745 – 2756, 2008.

DIMER, F. A. et al. Impactos da nanotecnologia na saúde : produção de medicamentos. **Química Nova**, v. 36, n. 10, p 1520 – 1526, 2013.

EIKANE, M. H.; GOLMOHAMMAD, F.; HOMAMI, S. S., Extraction of pomegranate (*Punica granatum* L.) seed oil using superheated hexane. **Food and Bioproducts Processing**, v. 90, p. 32 – 36, 2012.

FELDMAN, M.; McMAHON, A. T. Cyclooxygenase-2 inhibitors provide benefits similar to those of traditional nonsteroidal antiinflammatory drugs, with less gastrointestinal toxicity? **Annuary International Medicine**, v. 132, p. 134-143, 2000.

FILIPPIN, F. B.; SOUZA, L. C. Amphotericin b associated with triglyceride-rich nanoemulsion: stability studies and *in vitro* antifungal activity. **Química Nova**, v. 31, n. 3, p. 591 – 594, 2008.

FIORUCCI, S.; ANTONELLI, E.; MORELLI, A. Mechanism of non-steroidal anti-inflammatory drug-gastrophaty. **Clinical Review: Digest Liver Disease**, v. 33, supl. 2, p. 35-43, 2001

FLORES, F. C. et al. Nanostructured systems containing an essential oil: protection against volatilization. **Química Nova**, v. 34, n. 6, p. 968 – 972, 2011.

GANTA, S.; AMIJI, M. Coadministration of paclitaxel and curcumin in nanoemulsion formulations to overcome multidrug resistance in tumor cells. **Molecular Pharmaceutics**, v. 6, n. 3, p. 928 – 939, 2009.

GAOE, H. et al. Anti-glioma effect and safety of docetaxel-loaded nanoemulsion. **Archives of Pharmacel Research**, v. 35, n. 2, p. 333 – 341, 2012.

GHOSH, V. et al. Cinnamon Oil Nanoemulsion Formulation by Ultrasonic Emulsification: Investigation of Its Bactericidal Activity. **Journal of Nanoscience and Nanotechnology**, v. 13, p. 114 – 122, 2013.

GOULA, A. M. Ultrasound-assisted extraction on pomegranate seed oil – Kinetic modeling. **Journal of Food Engineering**, *in press*, 2012.

HOAI, N. T. et al. Ketoprofen encapsulated cucurbit[6]uril nanoparticles: a new exploration of macrocycles for drug delivery. **Advances in natural sciences: nanoscience and nanotechnology**, v. 3, p. 1 – 5, 2012.

HOELLER, S.; SPERGER, A.; VALENTA, C. Lecithin based nanoemulsions: A comparative study of the influence of non-ionic surfactants and the cationic phytosphingosine on physicochemical behavior and skin permeation. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 370, p. 181 – 186, 2009.

HUERRE, M. R.; GUONON, P. Inflammation: patterns and new concepts. **Immunologic Research**, v. 147, p. 417 – 434, 1996.

JAFARI, S. M. et al. Re-coalescence of emulsion droplets during high-energy emulsification. **Food Hydrocolloids**, v. 22, p.1191 – 1202, 2008.

JOHANNINGSMEIER, S. D.; HARRIS, G. K. Pomegranate as a functional food and nutraceutical source. **Annual Review of Food and Science Technology**, v.2, p. 181 – 201, 2011.

JULIUS, D.; BASBAUM, A. I. Molecular mechanisms of nociception. **Nature**, v. 413, p. 203-210, 2001.

JUNYAPRASERT, V. B. et al. Q₁₀-loaded NLC versus nanoemulsions: Stability, rheology and *in vitro* skin permeation. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 377, p. 207 – 214, 2009.

KAUR et al. Current nanotechnological strategies for effective delivery of bioactive drug molecules in the treatment of tuberculosis. **Critical Reviews in Therapeutic Carrier systems**, v. 31, n. 1, p. 49 – 88, 2014.

KELMANN, R. G. et al. Carbamazepine parenteral nanoemulsions prepared by spontaneous emulsification process. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 342, p. 231 – 239, 2007.

KHERADMANDNIA, S. et al. Preparation and characterization of ketoprofen-loaded solid lipid nanoparticles made from beeswax and carnauba wax. **Nanomedicine**, v. 6, p. 753 – 759, 2010.

KIM, N. D. et al. Chemopreventive and adjuvant therapeutic potential of pomegranate (*Punica granatum*) for human breast cancer. **Breast Cancer Research and Treatment**, v. 71, p. 203 – 217, 2002.

KIM, B. S.; YANG, M. W.; LEE, K. M. *In vitro* permeation studies of nanoemulsions containing ketoprofen as a model drug. **Drug Delivery**, v. 15, p. 465 – 469, 2008.

KLNAWAY, O. S. et al. Parameter selection of nanoemulsification processes: conditions for nano- and macroemulsions. **Chemical Engineering Technology**, v. 35, n. 9, p. 1604 – 1608, 2012.

KOLEVA, I. I. et al. Screening of plant extracts for antioxidant activity: a comparative study on three testing methods. **Phytochemical Analysis**, v. 13, p. 8 – 17, 2002.

KOROLKOVAS, A.; FRANÇA, F. F. **Dicionário Terapêutico Guanabara**. Edição 2000/2001. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001.

KOROLEVA, M. Y.; YURTOV, E. V. Nanoemulsions: the properties, methods of preparation and promising applications. **Russian Chemical Reviews**, v. 81, n. 1, p. 21 – 43, 2012.

KUO, F. et al. Nanoemulsion of an anti-oxidant synergy formulation containing gamma tocopherol have enhanced bioavailability and anti-inflammatory properties. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 363, p. 206 – 213, 2008.

LANSKY, E. P.; NEWMAN, R. A. *Punica granatum* (pomegranate) and its potential for prevention and treatment of inflammation and cancer. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 109, p. 177 – 206, 2007.

LARSEN, A. T. et al. Oral bioavailability of cinnarizine in dogs: Relation of SNEDDS droplet size, drug solubility and *in vitro* precipitation. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 48, p. 339 – 350, 2013

LEES, P. et al. Pharmacodynamics and pharmacokinetics of nonsteroidal anti-inflammatory drugs in species of veterinary interest. **Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics**, v. 27, p. 479 – 490, 2004.

LI, X. et al. Nanoemulsions coated with alginate/chitosan as oral insulin delivery systems: preparation, characterization, an hypoglycemic effect in rats. **International Journal of Nanomedicine**, v. 8, p. 23 – 32, 2013.

LIU, G. et al. Effects os supercritical CO₂ extraction parameters on chemical composition and free radical-scavenging activity of pomegranate (*Punica granatum* L.) seed oil. **Food and Bioproducts Processing**, v. 90, p. 573 – 578, 2012.

MAALI, A.; MOSAVIAN, M. T. H. Preparation and application of nanoemulsions in the last decade (2000 – 2010). **Journal of Dispersion Science and Technology**, v. 34, n. 1, p. 92 – 105, 2013.

MATTHEOLABAKIS, G.; RIGAS, B.; CONSTANTINIDES, P. P. Nanodelivery strategies in câncer chemotherapy: biological rationale and pharmaceutical perspectives. **Nanomedicine**, v. 7, n. 10, p. 1577 – 1590, 2012.

MARCATO, P. D.; DURÁN, N. New Aspects of Nanopharmaceutical Delivery Systems . **Journal of Nanoscience and Nanotechnology**, v. 8, p. 1 – 14, 2008.

MARCONDES SARI, M. H. et al. Contribution of dopaminergic and adenosinergic systems in the antinociceptive effect of p-chloro-selenosteroid. **European Journal of Pharmacology**, v. 725, p. 79-86, 2014.

MAS, S.; TAULER, R.; JUAN, A. Chromatographic and spectroscopic data fusion analysis for interpretation of photodegradation processes. **Journal of Chromatography A**, v.1218, p. 9260 – 9268, 2011.

MASON, T. G. et al. Effective structure factor of osmotically deformed nanoemulsions. **The Journal of Physical Chemistry B**, v. 110, p. 22097 – 22102, 2006.

MEDZHITOV, R. Origin and physiological roles of inflammation. **Nature**, v.454, p. 428 – 435, 2008.

MEI, L. et al. Pharmaceutical nanotechnology for oral delivery of anticancer drugs. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 65, p. 880 – 890, 2013.

MENDES, S. et al. Uptake by breast carcinoma of a lipidic nanoemulsion after intralesional injection into the patients: A new strategy for neoadjuvant chemotherapy. **Gynecologic Oncology**, v. 112, p. 400 – 404, 2009.

MESSLINGER , K. What is a nociceptor? **Anaesthetist**, v. 46, n. 2, p. 142-53, 1997

MISTRY, P. H., MOHAPATRA, S. K., DASH, A. K. Effect of high-pressure homogenization and stabilizers in the physicochemical properties of curcumin-loaded glycerol monooleate/chitosan nanostructures. **Nanomedicine**, v. 7, n. 12, p. 1863 – 1876, 2012.

- MIZRAHI, M. et al. Pomegranate seed oil nanoemulsions for the prevention and treatment of neurodegenerative diseases: the case of genetic CJD. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine**, article *in press*, 2014.
- MOHAGHEGHI, M. et al. Pomegranate seed oil as a functional ingredient in beverages, **European Journal of Lipid Science and Technology**, v. 113, p. 730-736, 2011.
- MOHAN, P., RAPOPORT, N. Doxorubicin as a molecular nanotheranostic agent: Effect of doxorubicin encapsulation in micelles or nanoemulsions on the ultrasound-mediated intracellular delivery and nuclear traffickink. **Molecular Pharmaceutics**, v. 7, n. 6, p. 1959 – 1973, 2010
- MONTEIRO, L. M. et al. Development and characterization of a new oral dapsone nanoemulsion system: permeability and in silico bioavailability studies. **International Journal of Nanomedicine**, v. 7, p. 5175 – 5182, 2012.
- MORA-HUERTAS, C. E.; FESSI, H.; ELAISSARI, A. Polymer-based nanocapsules for drug delivery. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 385, p. 113-142, 2010.
- MOUSSEAU, M. et al. Study of the expression of four chemoresistance-related genes in human primary and metastatic brain tumours. **European Journal of Cancer**, v. 29, n. 5, p. 753 – 759, 1993.
- NEUGEBAUER, V. et al. Forebrain pain mechanisms. **Brain Research Reviews**, v. 60, p. 226 – 242, 2009.
- NUCHUCHUA, O. et al. *In vitro* characterization and mosquito (*Aedes aegypti*) repellent activity of essential-oils-loaded nanoemulsions. **AAPS – Pharmaceutical Science Technology**, v 10, n. 4, p. 1234 – 1242, 2009.
- OSTERTAG, F.; WEISS, J.; McCLEMENTS, D. J. Low-energy formations of edible nanoemulsions: Factors influencing droplet size produced by emulsions phase inversion. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 388, p. 95 – 102, 2012.
- PARASHAR, A.; SINHA, N.; SINGH, P. Lipid contents and fatty acids composition of seed oil from twenty five pomegranate varieties grown in India. **Advance Journal of Food Science and Technology**, v. 2, n. 1, p. 12 – 15, 2010.

PARK, H. M. et al. Extract of *Punica Granatum* inhibits skin photoaging induced by UVB irradiation. **International Journal of Dermatology**, v. 49, p. 276 – 282, 2010.

PATEL, S. K. et al. Cyclooxygenase-2 inhibiting perfluoropoly (ethylene glycol) ether theranostic nanoemulsions – *In vitro* study. **Plos One**, v. 8, p. 1 – 11, 2013.

PATHAK, M. K. et al. Design and development of a novel pH triggered nanoemulsified *in-situ* ophthalmic gel of fluconazole: *Ex-vivo* transcorneal permeation, corneal toxicity and irritation testing. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, v. 39, n. 5, p. 780 – 790, 2013.

PINARDI, G.; SIERRALTA, F.; MIRANDA, H. F. Interaction between the antinociceptive effect of ketoprofen and adrenergic modulatory systems. **Inflammation**, v. 25, n. 4, p. 233 – 239, 2001.

PRIMO, F. L. et al. Magnetic nanoemulsions as drug delivery system for Fascan[®]: Skin permeation and retention *in vitro* assays for topical application in photodynamic therapy (PDT) of skin cancer. **Journal of Magnetism and Magnetic Materials**, v. 311, p. 354 – 357, 2007.

PRIMO, F. L. et al. *In vitro* studies of cutaneous retention of magnetic nanoemulsion loaded with zinc phthalocyanine for synergic use in skin cancer treatment. **Journal of Magnetism and Magnetic Materials**, v. 320, p. e211 – e214, 2008.

POULSEN, H. E.; PRIEME, H.; LOFT S. Role of oxidative DNA damage in cancer initiation and promotion. **European Journal of Cancer Prevention**, v. 7, p. 9 – 16, 1998.

RIBANI, M. et al. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. **Química Nova**, v. 27, n. 5, p. 771 – 780, 2004.

RIBAS, A. D. **Desenvolvimento de nanocápsulas contendo cetoprofeno e avaliação *in vitro* da citotoxicidade**. 2013. 61 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2013.

SABERI, A. H.; FANG, Y.; McCLEMENTS, D. J. Fabrication of vitamin E-enriched nanoemulsions: Factors affecting particle size using spontaneous emulsification. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 391, p. 95 – 102, 2013.

SADURNÍ, N et al. Studies on the formation of O/W nano-emulsions, by low-energy emulsification methods, suitable for pharmaceutical applications. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 26, p. 438–445, 2005.

SAKEENA, M. H. F. et al. Formulation and *in vitro* evaluation of ketoprofen in palm oil esters nanoemulsion for topical delivery. **Journal of Oil Science**, v. 59, n. 4, p. 223 – 228, 2010.

SALVIA-TRUJILLO, L. et al. Effect of processing parameters on physicochemical characteristics of microfluidized lemongrass essential oil-alginate nanoemulsions. **Food Hydrocolloids**, v. 30, p. 401 – 407, 2013.

SANTOS-MAGALHÃES, N. S. et al. Colloidal carriers for benzathine penicillin G: Nanoemulsions and nanocapsules. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 208, p. 71 – 80, 2000.

SCHAIBLE, H. -G. et al. The role of proinflammatory cytokines in the generation and maintenance of joint pain. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1193, p. 60 - 69, 2010.

SCHAFFAZICK, S. R. et al. Caracterização e estabilidade físico-química de sistemas poliméricos nanoparticulados para administração de fármacos. **Química Nova**, v. 25, n. 5, p. 726-737, 2003.

SCHUBERT, A. Y.; LANSKY E. P.; NEEMAN, I. Antioxidant and eicosanoid enzyme inhibition properties of pomegranate seed oil and fermented juice flavonoids. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 66, p. 11 – 17, 1999.

SEVICOKA, P. et al. On the preparation and characterization of nanoemulsion produced by phase inversion emulsification. **Colloids and Surface A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 420, p. 130 – 135, 2012.

SHAH, P.P.; DESAI, P. R.; SINGH, M. Effect of oleic acid modified polymeric bilayered nanoparticles on percutaneous delivery of spantide II and ketoprofen. **Journal of Controlled Release**, v. 128, p. 336 – 345, 2012.

SHAKEEL, F. et al. Preparation and *in vivo* evaluation of indomethacin loaded true nanoemulsions. **Scientia Pharmaceutica**, v. 78, p. 47 – 56, 2010.

SHINODA, K.; SAITO, H. The stability of O/W tyoe emulsions as functions of temperatura and the EHB of emulsifiers: The emulsification by PIT-method. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 30, n. 2, p. 258 – 263, 1969.

SILVA, P. Anti-inflamatórios não esteróides, analgésicos, antipiréticos e drogas utilizadas no tratamento da gota. **Farmacologia**, 8ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2010. cap 45, p. 439 – 366.

SINGH, R. P.; MURTHY, C. K. N.; JAYAAPRAKASHA, G. K. Studies on the antioxidant activity of pomegranate (*Punica granatum*) peel and seed extracts using *in vitro* models. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 50, p. 81 – 86, 2002.

SMALLEY, W. E. et al. Nonsteroidal anti-inflammatory drugs and the incidence of hospitalizations for peptic ulcer disease in elderly persons. **American Journal of Epidemiology**, v. 141, p. 539-545, 1995.

SOLANS, C. et al. Nano-emulsions. **Current Opinion in Colloid and Interface Science**, v. 10, p. 102 – 110, 2005.

SOLANS, C., SOLÉ, I. Nano-emulsions: Formation by lower methods. **Current Opinion in Colloid and Interface Science**, v. 17, p. 246 – 254, 2012.

SUN, H. et al. Development and characterization of a novel nanoemulsion drug-delivery system for potential application in oral delivery of protein drugs. **International Journal of Nanomedicine**, v. 7, p. 5529 – 5543, 2012.

SYED, D. N.; AFAQ, F.; MUKHTAR, H. Pomegranate derived products for cancer chemoprevention. **Seminars in Cancer Biology**, v. 17, p. 377 – 385, 2007.

TANG, S. Y. et al. Anti-inflammatory and analgesic activity of novel oral aspirin-loaded nanoemulsion and nano multiple emulsion formulations generated using ultrasound cavitation. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 430, p. 299 – 306, 2012.

TANG, S. Y.; SHRIDHARAN, P.; SIVAKUMAR, M. Impact of process parameters in the generation of novel aspirin nanoemulsions – Comparative studies between ultrasound cavitation and microfluidizer. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 20, p. 485 – 497, 2013.

TARTAU, L.; CAZACU, A.; MELNIG, V. Ketoprofen-liposomes formulation for clinical therapy. **Journal of Materials Science: Materials in Medicine**, v. 23, p. 2499 – 2507, 2012.

TAYEL, S. A. et al. Promising ion-sensitive *in situ* ocular nanoemulsion gels of terbinafine hydrochloride: Design, *in vitro* characterization and *in vivo* estimation of the ocular irritation and drug pharmacokinetics in the aqueous humor of rabbits. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 443, p. 293 – 305, 2013.

TIAN, Y. et al. Optimization of ultrasonic-assisted extraction of pomegranate (*Punica granatum*) seed oil. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 20, p. 201 – 208, 2013.

TJØLSEN, A.; HOLE, K. Animal models of analgesia. em: dickenson, A., Besson, J. (eds). **The Pharmacology of Pain, Springer: Verlag, Berlin**.v. 130, n. 1, p. 1-20, 1997.

TONNESEN, H. H. Formulation and stability testing of photolabile drugs. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 225, p. 1 – 14, 2001.

VERRI Jr, W.A. et al. Hypernociceptive role of cytokines and chemokines: Targets for analgesic drug development? **Pharmacology and Therapeutics**, v.112, p.116-138, 2006.

VUCEN, S. R. et al. Improved percutaneous delivery of ketoprofen using combined application of nanocarriers and silicon microneedles. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 65, p. 1451 – 1462, 2013.

ZHANG, Z. et al. A high-drug-loading self-assembled nanoemulsion enhances the oral absorption of probucal in rats. **Pharmaceutical Nanotechnology**, v. 102, n. 4, p. 1301 – 1306, 2013.

ZHAO, Q.; HO, T.; HUANG, Q. Effect of Ubiquinol-10 on Citral Stability and Off-Flavor Formation in Oil-in-Water (O/W) Nanoemulsions. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v.61, p. 7462 – 7469, 2013.

ZIANI, K. et al. Influence of Surfactant Charge on Antimicrobial Efficacy of Surfactant Stabilized Thyme Oil Nanoemulsions. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v. 59, p. 6247 – 6255, 2011.

WADHWA, J.; NAIR, A.; KUMRIA, R. emulsion forming drug delivery system for lipophilic drugs. **Acta Poloniae Pharmaceutica – Drug Research**, v. 69, n.2, p. 179 – 191, 2012

WANG, R. et al. Bioactive compounds from the seeds of *punica granatum* (pomegranate). **Journal of Natural Products**, v. 67, p. 2096 – 2098, 2004.

WINDHAB, E. J. et al. Emulsion processing-from single-drop deformation to design of complex processes and products. **Chemical Engineering Science**, v. 60, p. 2101- 2113, 2005.

WOOLF, C. J.; SALTER, M. W. Neuronal plasticity: increasing the gain in pain. **Science**, v. 288, p. 1765 – 1769, 2000.

WONG, H. L; WU, X. Y.; BENDAYAN, R. Nanotechnological advances for the delivery of CNS therapeutics. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 64, p. 686 – 700, 2012.

WU, L.; ZHANG, J.; WATANABE, W. Physical and chemical stability of drug nanoparticles, **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 63, p. 456–469, 2011.

YAMASAKI, M. et al. Dietary effect of pomegranate seed oil on immune function and lipid metabolism in mice. **Nutrition**, v. 22, p. 54-59, 2006.

YANG, Y. et al. Fabrication of edible emulsions: Comparison of high-energy and low-energy homogenization methods. **Food Hydrocolloids**, v. 29, p. 398 – 406, 2012.