



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PÓS-GRADUAÇÃO EM NANOCIÊNCIA E NANOBIOTECNOLOGIA

TESE DE DOUTORADO

**DESENVOLVIMENTO DE NANOCARREADORES FORMADOS POR
MICELAS DE PLURONIC F127 OU NANOEMULSÕES PARA VEICULAÇÃO DE
INTERFERON GAMMA E AVALIAÇÃO DO POTENCIAL IMUNOMODULADOR**

ELTON BRITO RIBEIRO

BRASÍLIA - DF

2016

ELTON BRITO RIBEIRO

**DESENVOLVIMENTO DE NANOCARREADORES FORMADOS POR
MICELAS DE PLURONIC F127 OU NANOEMULSÕES PARA VEICULAÇÃO DE
INTERFERON GAMMA E AVALIAÇÃO DO POTENCIAL IMUNOMODULADOR**

ORIENTADORA

Professora MARIA APARECIDA GODOY SOLER

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Nanociência e Nanobiotecnologia da Universidade de Brasília como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Nanociência e Nanobiotecnologia.

BRASÍLIA - DF

2016



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
Programa de Pós-Graduação em Nanociência e Nanobiotecnologia

Tese de Doutorado

Elton Brito Ribeiro

Título:

**“DESENVOLVIMENTO DE NANOCARREADORES FORMADOS POR
MICELAS DE PLURONIC F127 OU NANOEMULSÕES PARA VEICULAÇÃO DE
INTERFERON GAMMA E AVALIAÇÃO DO POTENCIAL IMUNOMODULADOR”**

Comissão Examinadora

Professora Maria Aparecida Godoy Soler
Presidente / Orientadora
IF / UNB

Prof. Dr. João Paulo Longo
Membro Titular Interno Vinculado ao Programa
IB / UNB

Profa. Dra. Taís Gratieri
Membro Titular Interno Não Vinculado ao Programa
FS / UNB

Prof. Dr. Leonardo Giordano Paterno
Membro Titular Interno Não Vinculado ao Programa
IQ / UNB

Profa. Dra. Danny Laura G.Fagundes
Membro Titular Externo Não Vinculado ao Programa
ICBS / UFMT

Brasília – DF, 22 de Junho de 2016.

Dediquei, dedico e dedicarei as conquistas da vida aos meus amores incondicionais:

A DEUS-Jesus-Espírito Santo-, misericordiosos, pela compaixão e oportunidade da vida.

Ao maior dos homens, Valmiro G. Ribeiro, pela lição de bondade, honra, honestidade e dignidade!

Ao maior dos tesouros, Nilza Brito Ribeiro, pelo amor, carinho, afagos, perseverança e fé!

A minha amiga, namorada, esposa, mulher e amante, Patrícia Kelly Dias Lanes, pela paciência, dedicação, afeto, companheirismo, amor e por estar enfrentando o mundo ao meu lado!

Ao meu irmão, Valmiro Jr, pelo companheirismo!

E ao maior presente que recebi, um pedacinho de céu, Thais, por quem lutarei a vida toda, assim como as pessoas acima lutam por mim!

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus-Jesus-Espírito Santo pela presença em minha vida, pela misericórdia, pelo amor incondicional e pela oportunidade de renovação da fé a cada oração e o sentimento de segurança por acreditar que o melhor está por vir.

A minha orientadora, Profa. Maria Aparecida Godoy Soler pelas valiosas lições, amizade, paciência, atenção e direcionamento dos trabalhos que foram realizados. Um exemplo de profissionalismo, competência, dedicação, pessoa e companheirismo que levarei comigo com eterna gratidão. A confiança dedicada a mim, mesmo antes de nos conhecermos, pretendo nunca desapontar. A sua sabedoria, dedicação, espectro de juventude e o pensar científico inovador é um exemplo a ser seguido por todo cientista.

Ao Prof. Eduardo Luzia França e Prof.^a Adenilda Cristina Honório França pelas valiosas orientações e participação em todo meu amadurecimento científico. Agradeço por receberem tão carinhosamente a minha família e por não medir esforços em apoiar nossas decisões. A forma de trabalho humanizado, compreensivo e profissional que vocês adotam é um exemplo a ser seguido por qualquer educador.

Aos companheiros de Brasília Camila Letti, Luiz Miguel, Ana Paula, Antônia, Deizilene, Luana, Alberto, Ariane e Alexandre. Agradecer a amigos seria uma missão infinita, porque estiveram comigo nas felicidades, dificuldades e principalmente nas necessidades, portanto sou muito grato. Ao pessoal de Barra do Garças que me deu apoio: Aron Carlos, Danny, Patrícia, Aliny, Rubian e Miriã. Ao meu amigo Paulo Leventi que possibilitou o contato com o programa quando já não havia possibilidade a meu ver. A todos do CNANO e da PPGNANO.

A todos os professores da Universidade de Brasília e da Universidade Federal de Mato Grosso, em especialmente a todos os professores do PPGNANO em nome do Prof. Sebastião William da Silva, que dedicam suas vidas a estas instituições e que a duras penas desenvolvem e estimulam o conhecimento científico. Estes profissionais necessitam de maior reconhecimento de toda sociedade.

Aos companheiros do início da vida científica Fernando Boldrini, Aron Carlos de Melo Cotrim e Angélica de Jesus Silva.

Aos grandes mestres da infância e adolescência escolar, professores e amigos de Colorado do Oeste-RO, minha cidade natal de que tanto me orgulho. A oportunidade de receber um conhecimento base sustentável, passou irrevogavelmente pelo Instituto Educacional Dimensão e Escola Agrotécnica Federal – EAFCOL, e se estou aqui hoje devo muito ao trabalho dessas instituições.

A toda minha família que sempre acreditou nos meus sonhos e perspectivas. Especialmente à Rosa, Jomar e Talita Lanes, meus pais, minha esposa, minha filha, pelo amor, compreensão, carinho e dedicação principalmente nas horas difíceis e compartilhando aquelas felizes. Obrigado por estarem sempre ao meu lado, pois sozinho eu não teria forças.

Obrigado a todos por fazerem parte do desafio!

***“Tudo quanto te vier à mão para fazer,
faze-o conforme as tuas forças, porque
na sepultura, para onde tu vais, não há
obra, nem indústria, nem ciência, nem
sabedoria alguma.” (Ec 9:10)***

RESUMO

O objetivo deste estudo foi desenvolver novas formulações contendo IFN- γ , visando sua utilização como agente imunomodulador. As formulações foram produzidas a partir de diferentes sistemas coloidais formados por nanoemulsões ou micelas nanoestruturadas. As nanoemulsões à base de água destilada, triglicerídeo de ácido cáprico/caprílico, oleato de sorbitano (SP), polissorbato 80 (TW) e propilenoglicol (PG) ou 1-butanol (BT) foram preparadas por ultrahomogeneização. As dispersões, formadas pelo copolímero Pluronic F127 em solução tampão fosfato (pH 7.4), foram preparadas nas concentrações de 10 mg.mL⁻¹, 50 mg.mL⁻¹ e 250 mg.mL⁻¹. As nanoemulsões e dispersões desenvolvidas foram caracterizadas para obter o tamanho hidrodinâmico, índice de polidispersão, carga superficial, estabilidade física preliminar e acelerada e propriedades reológicas. As nanoemulsões e dispersões estáveis foram selecionadas para incorporar nano doses de IFN- γ (100 ng.mL⁻¹). A influência do IFN- γ incorporado nas formulações desenvolvidas na atividade funcional das células mononucleares para *Escherichia coli* enteropatogênica foi analisada por meio da liberação de ânion superóxido, fagocitose e atividade microbicida. Em adição, a influência das formulações sobre a atividade funcional das células mononucleares, das células de câncer de mama humano (MCF-7) e da co-cultura de ambas, foi estudada por meio do teste de permeabilidade celular ao iodeto de propídeo e da liberação de cálcio intracelular. As formulações otimizadas permaneceram estáveis em condições extremas durante 90 dias, com valores de pH biocompatíveis, sem alteração significativa dos perfis reológicos, diâmetro hidrodinâmico com dimensões nanométricas, potencial zeta negativo, e sem variações significativas da dose do IFN- γ (100 ng.mL⁻¹). Os ensaios biológicos mostraram que as formulações desenvolvidas não alteram a taxa de viabilidade das células mononucleares e aumentaram a liberação de superóxido, o índice de fagocitose e a liberação de cálcio intracelular das células mononucleares do sangue humano, quando se comparou ao grupo espontâneo. Além disso, as nanoemulsões são capazes de promover a morte das células de câncer de mama humano MCF-7 ou em co-cultura. Os resultados indicam que as formulações produzidas podem melhorar a atividade biológica do IFN- γ .

Palavras chaves: Nanoemulsão, Pluronic 127, Micelas nanoestruturadas, Imunomodulação, IFN- γ , Células mononucleares, Células de câncer de mama.

ABSTRACT

The aim of this study was to design and develop different formulations containing IFN- γ to probe their use as an immunomodulating agent. Produced formulations were based on two different nanoemulsion systems or nanostructured micelles. The nanoemulsions comprising distilled water, triglycerides of capric/caprylic acid, sobitan-oleate (SP), polysorbate 80 (TW) and propylene glycol (PG) or 1-butanol (BT) were prepared through ultra-homogenization. The pluronic 127 dispersions in phosphate buffer solution (pH 7.4) were prepared at concentrations of 10 mg.mL⁻¹, 50 mg.mL⁻¹ and 250 mg.mL⁻¹. The developed nanoemulsions and dispersions were characterized regarding droplet size, polydispersity, surface charge, preliminary and accelerated physical stability, and rheological properties. Stable products were selected to incorporate nano doses of IFN- γ (100 ng.mL⁻¹) and characterized under the same parameters. The influence of IFN- γ incorporated formulations on functional activity of mononuclear cell for *Escherichia coli* enteropathogenic was analyzed through superoxide release, phagocytosis and microbicidal activity. By means of cell permeability tests to propidium iodide and intracellular calcium release were employed to study the formulations influence on functional activity of mononuclear cell, human breast cancer (MCF-7) and co-culturing both. The optimized formulations remained stable in extreme conditions during 90 days, displaying biocompatible pH value, significant maintenance of its rheological profile, nanometric hydrodynamic diameter, negative zeta potential and no significant variations of IFN- γ dose (100 ng.mL⁻¹). Additionally, developed formulations did not alter the MN cell viability rates and increased the superoxide release, phagocytosis index and intracellular calcium release of mononuclear cells of human blood compared to the spontaneous group. Furthermore, the nanoemulsions were able to promote the death of MCF-7 human breast cancer or co-culturing. Our findings indicate that the produced formulations can improve the biological activity of IFN- γ .

Keywords: Pluronic F127, Nanoemulsion, Micelles, Immunomodulation, IFN- γ , Mononuclear cells, Breast cancer cells.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Ilustração das estruturas mais comuns de sistemas nanoemulsionados: A) Água em óleo (A/O); B) Bicontínua; e C) Óleo em água (O/A). Fonte: Arquivo pessoal, Adaptado de (LAWRENCE; REES, 2012). 27
- Figura 2.** Estruturas moleculares dos componentes escolhidos para a síntese das nanoemulsões A) Polissorbato 80, B) Oleato de sorbitano, C) 1-butanol, D) Propilenoglicol e E) triglicérides de ácido cáprico/caprílico. 29
- Figura 3.** Ilustração de nanoestruturas na forma de micela, nanoesfera e nanocápsula, conforme indicado. Fonte: Arquivo pessoal, adaptado de (NAMBAM; PHILIP, 2012; STANISÇUASKI et al., 2003). 30
- Figura 4.** Estrutura molecular do copolímero Pluronic F-127 31
- Figura 5.** Esquema da estrutura cristalina do IFN- γ 33
- Figura 6.** Esquema dos experimentos que foram realizados. 37
- Figura 7.** Ilustração das técnicas e das etapas empregadas para caracterização das NEs e MNPs desenvolvidas. (Fonte: Arquivo pessoal). 39
- Figura 8.** Curva de fluxo (A) e de viscosidade (B) de um líquido Newtoniano. Fonte: Arquivo pessoal, adaptado de (SCHRAMM, 2000). 41
- Figura 9.** Exemplos de curvas de fluxos de líquidos Não-Newtonianos. As curvas em preto se referem a plástico de Bingham; em azul a pseudoplástico e em vermelho a dilatante. Fonte: Arquivo pessoal, adaptado de (SCHRAMM, 2000). 42
- Figura 10.** Ilustração dos componentes do citômetro de fluxo e do sistema de leitura. Fonte: <http://gic.casaccia.enea.it/images/Citometro.jpg> 49
- Figura 11.** Ilustração do processo da síntese das NEs por meio do método de ultrahomogeneização e definição das proporções dos componentes empregando diagramas pseudoternários. Cada ponto se refere a uma amostra preparada. A ilustração do sistema preparado O/A, bem como a imagem de uma de NE selecionada se encontram na parte inferior da Figura. (Fonte: Arquivo pessoal). 54

Figura 12. Ilustração do processo da síntese das MNPs por meio do método auto estruturante. A imagem da direita se refere a uma das amostras preparadas. (Fonte: Arquivo pessoal).	55
Figura 13. Ilustração das etapas e avaliações realizadas nos estudos de estabilidade utilizadas para o desenvolvimento das NEs e NPs.	62
Figura 14. Diagramas pseudoternários de classificação dos pontos (a) e de domínios de região com as nanoemulsões selecionadas (b) do sistema SP/TW/P.	74
Figura 15. Diagramas pseudoternários de classificação dos pontos (a) e de domínios de região com as nanoemulsões selecionadas (b) do sistema SP/TW/B.	75
Figura 16. Curvas de fluxo obtidas das nanoemulsões pré-selecionados do sistema NEP (25°C).	76
Figura 17. Curvas de viscosidade obtidas das nanoemulsões do sistema NEP (25°C).	77
Figura 18. Curva de viscosidade de nanoemulsões do sistema NEP em função da temperatura (5 a 45°C).	79
Figura 19. Curvas de fluxo das formulações (1, 3 e 5NEPIFN- γ) selecionadas do sistema NEP (25°C).	80
Figura 20. Curvas de viscosidade das formulações (1, 3 e 5NEPIFN- γ) selecionadas do sistema NEP (25°C).	81
Figura 21. Curvas de viscosidade das formulações (1, 3 e 5NEPIFN- γ) selecionadas do sistema NEP, em função da temperatura (5 a 45°C).	82
Figura 22. Curva de fluxo das nanoemulsões pré-selecionados do sistema NEB (25°C).	83
Figura 23. Curva de viscosidade das nanoemulsões pré-selecionadas do sistema NEB (25°C).	84

Figura 24. Curva de viscosidade das nanoemulsões pré-selecionadas do sistema NEB em função da temperatura (5 a 45°C).....	85
Figura 25. Curvas de fluxo das formulações (3, 4, 5, 6, 8, 8, 10 e 11NEBIFN- γ) do sistema NEB (25°C).	86
Figura 26. Curvas de viscosidade das formulações (3, 4, 5, 6, 8, 8, 10 e 11NEBIFN- γ) do sistema NEB (25°C).	87
Figura 27. Curvas de viscosidade das formulações (3, 4, 5, 6, 8, 8, 10 e 11NEBIFN- γ) do sistema NEB em função da temperatura (5 a 45°C).....	88
Figura 28. Distribuição de tamanho de gotículas das nanoemulsões (1,3, e 5NEP) e formulações (1,3,5NEP IFN- γ) do sistema NEP.	90
Figura 29. Distribuição de tamanho de gotículas das formulações do sistema NEB.....	92
Figura 30. Curvas de fluxo das dispersões pré-selecionadas (127-10 e F127-50) (25°C).....	96
Figura 31. Curvas de viscosidade das dispersões pré-selecionadas (127-10 e F127-50) (25°C).	96
Figura 32. Curvas de viscosidade das dispersões pré-selecionadas 127-10, F127-50 e F127-250 em função da temperatura (5 a 45°C).....	97
Figura 33. Curva de fluxo das formulações 127-10IFN- γ e F127-50IFN- γ (25°C).98	
Figura 34. Curvas de viscosidade das formulações 127-10IFN- γ e F127-50IFN- γ (25°C).....	98
Figura 35. Curvas de viscosidade das formulações 127-10IFN- γ , F127-50IFN- γ e F127-250IFN- γ em função da temperatura (5 a 45°C).	99

Figura 36. Comportamento dos módulos de armazenagem G' e de perda G'' em função da frequência da dispersão F127-250 bem como as respectivas imagens em diferentes temperaturas (5, 19 e 25°C).	102
Figura 37. Comportamento dos módulos de armazenagem G' e de perda G'' em função da frequência da formulação F127-250IFN- γ bem como as respectivas imagens em diferentes temperaturas (5, 19 e 25°C).	102
Figura 38. Curvas do ângulo de defasagem em função da frequência da dispersão F127-250 para diferentes temperaturas (5, 19 e 25°C).	104
Figura 39. Ângulo de defasagem em função da frequência da formulação F127-250IFN- γ para diferentes temperaturas (5, 19 e 25°C).	104
Figura 40. Distribuições de tamanho das micelas das dispersões (F127-10 e F127-50) e das formulações (F127-10IFN- γ e F127-50IFN- γ).	106
Figura 41. Curva de fluxo (a) e viscosidade (b) médio das formulações durante o período de estabilidade apresentado por cada formulação (25°C).	113
Figura 42. Valores de potencial Zeta das formulações produzidas durante o período de estabilidade acelerada (0, 45 e 90 dias).	114
Figura 43. Valores médios de diâmetro hidrodinâmico das formulações produzidas durante o período de estabilidade acelerada (0, 45 e 90 dias).	115
Figura 44. Dosagem de interferon gamma nas formulações durante o período de estabilidade acelerada.	116
Figura 45. Índice de viabilidade celular dos fagócitos MN do sangue periférico humano com diferentes tratamentos (1NEPIFN- γ , 11NEBIFN- γ e F127-50IFN- γ , e como controle o PBS) e tempos de incubação (0; 0,5; e 24 h).	120
Figura 46. Liberação de ânion superóxido das células MN do sangue periférico humano na presença de <i>E. coli</i> em diferentes tratamentos (1NEPIFN- γ , 11NEBIFN- γ e F127-50IFN- γ , e como controles o IFN- γ , PBS, a dispersão F127-50, e as nanoemulsões 1NEP e 11NEB) e tempos de incubação (0; 0,5; 1 e 2 h).	121

Figura 47. Índice de Fagocitose das células MN do sangue periférico humano na presença de *E. coli* em diferentes tratamentos (1NEPIFN- γ , 11NEBIFN- γ e F127-50IFN- γ , e como controles o IFN- γ , PBS, a dispersão F127-50, e as nanoemulsões 1NEP e 11NEB) e tempos de incubação (0; 0,5; 1 e 2 h)..... 123

Figura 48. Atividade bactericida das células MN do sangue periférico humano na presença de *E. coli* em diferentes tratamentos (1NEPIFN- γ , 11NEBIFN- γ e F127-50IFN- γ , e como controles o IFN- γ , PBS, a dispersão F127-50, e as nanoemulsões 1NEP e 11NEB) e tempos de incubação (0; 0,5; 1 e 2 h)..... 124

Figura 49. Índice de viabilidade celular dos fagócitos MN e das células MCF-7 de câncer de mama humano, e sua mistura, indicado pela intensidade de fluorescência média de permeabilidade celular ao iodeto de propídio, para os estímulos (1NEPIFN- γ , 11NEBIFN- γ e F127-50IFN- γ , e como controles o IFN- γ , PBS, a dispersão F127-50, e as nanoemulsões 1NEP e 11NEB)..... 125

Figura 50. Liberação intracelular de Ca^{2+} dos fagócitos MN sanguíneos e das células MCF-7 de câncer de mama humano indicado pela intensidade de fluorescência. 127

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1.** Valores calculados de percentagens e EHL obtidos para a mistura de tensoativos e co-tensoativos. 72
- Tabela 2.** Valores de área de histerese e classificação do fluxo dos pontos pré-selecionados do sistema NEP, obtidos a partir dos dados da Figura 16..... 77
- Tabela 3.** Valores de viscosidade e características do fluxo dos pontos do sistema NEP, obtidos da Figura 17. 78
- Tabela 4.** Valores de área de histerese e classificação do fluxo das formulações (1, 3 e 5NEPIFN- γ) selecionadas do sistema NEP, obtidos a partir dos dados da Figura 19. 80
- Tabela 5.** Valores de viscosidade e características do fluxo das formulações (1, 3 e 5NEPIFN- γ) selecionadas do sistema NEP, obtidos da Figura 20. 81
- Tabela 6.** Valores de área de histerese e classificação do fluxo das nanoemulsões pré-selecionados do sistema NEB, obtidos a partir dos dados da Figura 22. 83
- Tabela 7.** Valores de viscosidade e características do fluxo das nanoemulsões do sistema NEB, obtidos a partir dos dados da Figura 23. 84
- Tabela 8.** Valores área de histerese e classificação do fluxo das formulações (3, 4, 5, 6, 8, 8, 10 e 11NEBIFN- γ) do sistema NEB, obtidos a partir dos dados da Figura 25. 87
- Tabela 9.** Valores de viscosidade e característica do fluxo das formulações (3, 4, 5, 6, 7, 8, 10 e 11NEBIFN- γ) do sistema NEB, obtidos a partir dos dados da Figura 26. 88
- Tabela 10.** Valores de potencial zeta, índice de polidispersividade e diâmetro hidrodinâmico médios das formulações do sistema NEP, obtidos a partir dos dados da Figura 28. 89

Tabela 11. Valores de potencial zeta, índice de polidispersividade e diâmetro hidrodinâmico médios das nanoemulsões (3,4,5,6,7,8,10 e 11NEB) formulações (3 a 11NEBIFN- γ) do sistema NEB, obtidos dos dados da Figura 29..... 91

Tabela 12. Valores da área de histerese e classificação do fluxo das dispersões pré-selecionadas 127-10 e F127-50 e das formulações 127-10IFN- γ e F127-50IFN- γ obtidos a partir dos dados das Figuras 30 e 33. 100

Tabela 13. Valores de viscosidade e característica do fluxo das dispersões pré-selecionadas (127-10 e F127-50) obtidos a partir dos dados das Figuras 31 e 34. 100

Tabela 14. Potencial zeta, índice de polidispersividade e diâmetro hidrodinâmico médios das dispersões (F127-10 e F127-50) e formulações (F127-10IFN- γ e F127-50IFN- γ). O índice de polidispersividade e diâmetro hidrodinâmico foram obtidos a partir da Figura 40..... 106

Tabela 15. Parâmetros obtidos por meio das análises físico-químicas antes e após a realização dos testes de estabilidade preliminar dos sistemas NEP, NEB e F127, com ou sem incorporação de IFN- γ 110

Tabela 16. Parâmetros obtidos por meio das análises físico-químicas antes (0) e após (45 e 90 dias) da realização dos testes de estabilidade acelerada das formulações relativas aos sistemas NEP, NEB e F127..... 111

Tabela 17. Liberação intracelular de Ca²⁺ dos fagócitos MN e das células MCF-7 de câncer de mama humano indicado pela intensidade de fluorescência. 128

LISTA DE ABREVIACOES E SIGLAS

A/O ou O/A – gua em leo ou leo em gua

BSA – *Bovine serum albumin*

D_H – Diâmetro hidrodinâmico

E. coli - *Escherichia coli*

EDL – Espalhamento dinâmico de luz

EG – Emulsão gel

EHL – Equilíbrio hidrfilo-lipfico

EL – Emulsão líquida

EPEC- *Escherichia coli* enteropatogênica

IFN- γ – Interferon gamma

MN - Mononuclear

MNPs – Micelas nanoparticuladas

NEBIFN- γ - Nanoemulsão que contm butanol e interferon gamma

NE – Nanoemulsão

NEB - Nanoemulsão que contm butanol

NEP - Nanoemulsão que contm propilenoglicol

NEPIFN- γ - Nanoemulsão que contm propilenoglicol e interferon gamma

NK – *Natural killer cells*

PBS - *Phosphate buffer saline*

F127 – Micela nanoparticuladas de Pluronic F127

F127IFN- γ - Micela nanoparticuladas de Pluronic F127 que contm interferon gamma

Potencial ζ – Potencial zeta

SF – Separao de fases

SVFs - sistemas de veiculao de fármacos

SP/TW/B – Oletado de sorbitano (Span 80), polissorbato 80 (Tween 80) e 1-butanol (B)

SP/TW/P – Oletado de sorbitano (Span 80), polissorbato 80 (Tween 80) e 1-propilenoglicol (P)

TSB - *Trypic Soy Broth*

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	21
1.1 Motivação	24
1.1.1 Sistemas de liberação de fármacos	24
1.1.2 Interferon gamma (IFN- γ)	32
1.2 Justificativa	34
1.3 Objetivos	35
2 TÉCNICAS DE CARACTERIZAÇÃO	39
2.1 Reologia	40
2.2 Espalhamento dinâmico de luz (EDL)	46
2.3 Potencial Zeta	46
2.4 Citometria de Fluxo	47
3 SÍNTESE DOS NANOCARREADORES	51
3.1 Materiais	51
3.2 Preparação dos sistemas nanoemulsionados	51
3.3 Preparação dos sistemas coloidais com micelas nanoestruturadas	55
3.4 Preparação dos sistemas com a incorporação de IFN-γ	55
4 PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS EMPREGADOS NA CARACTERIZAÇÃO E CONTROLE DE QUALIDADE DOS MATERIAIS SINTETIZADOS	58
4.1 Caracterizações Reológica	58
4.2 Caracterização por espalhamento dinâmico de luz	59
4.3 Controles de qualidade e caracterizações físico-químicas	60
4.4 Estudos de Estabilidade	61
5 ENSAIOS BIOLÓGICOS	64
5.1 Sujeitos e tamanho amostral	64
5.2 Obtenções de fagócitos do sangue periférico	64
5.3 Cultura de células	65
5.4 Linhagem e Culturas de <i>Escherichia coli</i> Enteropatogênica	65
5.5 Incubação dos fagócitos MN, das células MCF-7 e fagócitos MN/células MCF-7 com as nanoestruturas desenvolvidas	65
5.6 Viabilidade celular	67
5.7 Liberação de ânion superóxido	67

5.8 Avaliação da fagocitose e da atividade bactericida.....	68
5.9 Teste de Permeabilidade celular ao Iodeto de propídeo	68
5.10 Liberação de cálcio intracelular	69
5.11 Aspectos legais.....	69
5.12 Análises estatísticas	70
6 RESULTADOS: NANOEMULSÕES.....	72
6.1 Determinação da mistura de tensoativos	72
6.2 Preparação dos sistemas nanoemulsionados	73
6.3 Caracterização reológica	76
6.3.1 Nanoemulsões do sistema SP/TW/P (NEP).....	76
6.3.2 Nanoemulsões do sistema SP/TW/B (NEB).....	82
6.4 Caracterização por espalhamento dinâmico de luz.....	89
6.4.1 Nanoemulsões do sistema SP/TW/P (NEP).....	89
6.4.2 Nanoemulsões do sistema SP/TW/B (NEB).....	90
7. RESULTADOS: MICELAS DE PLURONIC 127	95
7.1 Caracterização reológica	95
7.2 Caracterização por espalhamento dinâmico de luz.....	105
8 RESULTADOS: CONTROLE DE QUALIDADE DAS FORMULAÇÕES PRODUZIDAS.....	109
8.1 Estabilidade preliminar	109
8.2 Estabilidade Acelerada.....	111
9 RESULTADOS: ENSAIOS BIOLÓGICOS.....	119
9.1 Ensaio Biológico.....	119
9.2 Índice de viabilidade.....	119
9.3 Liberação de ânion superóxido.....	120
9.4 Avaliação da fagocitose	122
9.5 Atividade Microbicida.....	123
9.6 Avaliação da permeabilidade celular ao iodeto de propídio	125
9.7 Liberação de cálcio intracelular	126
10 DISCUSSÃO	130
11 CONCLUSÕES	154
REFERÊNCIAS.....	159
APÊNDICE.....	176
ANEXO	177

CAPÍTULO 1

1 INTRODUÇÃO

Nanobiomateriais empregados como sistemas de liberação de fármacos têm contribuído para melhorar a eficiência do tratamento de muitas doenças, porém a sua aplicação em grande escala depende do desenvolvimento de novas alternativas terapêuticas, por exemplo, da síntese de novos sistemas carreadores, de diferentes vias de administração, e de adequações bionanotoxicológicas (PRIDGEN et al., 2013; SMITH et al., 2013).

Dentre os nanomateriais que têm sido empregados como sistemas de veiculação de fármacos (SVFs) pode-se citar as nanoemulsões (NEs) e as micelas nanoparticuladas (MNPs), sistemas estes que se destacam por promoverem alternativas terapêuticas eficientes, que possibilitam a administração de moléculas biologicamente ativas em local específico, com eficiência terapêutica relevante e efeitos colaterais mínimos (BONIFACIO et al., 2014; LAWRENCE; REES, 2012).

Os polímeros utilizados na síntese de materiais nanoestruturados têm sido aplicados para a veiculação de fármacos, vacinas e fotosensibilizadores (FARAJI; WIPF, 2009; KREUTER, 1996; PY-DANIEL et al., 2016) e como adjuvantes em imunoterapias (GÓMEZ et al., 2009; HARA et al., 2013). As NEs têm sido empregadas para veiculação de anti-inflamatórios como o celecoxib (BABOOTA et al., 2007) e o aceclofenaco (SHAKEEL et al., 2007), o clotrimazol na quimioterapia de malária (BORHADE et al., 2012), para veiculação de ftalocianina para terapia fotodinâmica e hipertermia em glioblastomas (DE PAULA et al., 2012), como adjuvante em vacinas para influenza (HAMOUDA et al., 2011) e em fitoformulações (AJAZUDDIN; SARAF, 2010).

A NE é definida como uma dispersão coloidal termodinamicamente instável constituída de dois líquidos imiscíveis, com um dos líquidos disperso na forma de pequenas gotículas (normalmente $r < 100$ nm) no outro líquido, onde a estabilidade é alcançada por meio da combinação de tensoativos (FRYD; MASON, 2012; MCCLEMENTS, 2012). As MNPs que têm sido muito investigadas como sistemas de veiculação de fármacos são as poliméricas, que são partículas coloidais esféricas que podem apresentar um núcleo hidrofóbico e o exterior hidrofílico sendo constituídas por polímeros copolímeros (TORCHILIN, 2005; ZHOU et al., 2011). Para a veiculação de fármacos estes sistemas podem ser apresentados na forma de micelas propriamente ditas, as vesículas e os complexos polieletrólíticos, de modo que o núcleo contenha o fármaco (VILLANOVA; ORÉFICE; CUNHA, 2010).

Os complexos nanoestruturados com formulações adequadas podem modificar a liberação de estímulos que atuam no sistema imunológico (MANDAL et al., 2010; SAJAN et al., 2009) permitindo a sua modulação de forma que proteja o organismo da atividade pró-inflamatória excessiva e que leve a uma resposta mais eficiente para determinadas doenças. (PESSOA et al., 2014; RIBEIRO et al., 2015; RIET; HARTGERS; YAZDANBAKHSH, 2007). A administração terapêutica de citocinas tem sido empregada com visando modificar a resposta imunológica em doenças como o câncer e doenças autoimunes ou infecciosas. Diversos estudos têm sido conduzidos com o objetivo de determinar as vias e concentrações ideais para a administração de citocinas (BARRATT, 2000; CHRISTIAN; HUNTER, 2013).

Entre as citocinas, o interferon- γ (IFN- γ) atua no processo de ativação e modulação das funções das células do sistema imunológico, pode promover a atividade fagocítica, o aumento da expressão de receptores de superfície e atuar na resposta microbicida dos fagócitos (FAGUNDES et al., 2013; SANCHEZ-MUÑOZ, 2008). O sucesso limitado das terapias que envolvem os IFNs é atribuído à dificuldade de fazê-lo atingir alvos específicos com doses adequadas (DUNN; KOEBEL; SCHREIBER, 2006). Com o objetivo de responder a essa demanda, biomateriais vêm sendo desenvolvidos para atuarem como transportadores de citocinas, e também com o objetivo de reduzir a apoptose em alguns órgãos nos quais elas podem ser consideradas tóxicas (GUAN et al., 2012).

Estudos realizados por nossa equipe mostraram que nanodoses de IFN- γ (100 ng.mL^{-1}) são suficientes para atuar na atividade funcional dos fagócitos do sangue quando incubadas com bactérias (FAGUNDES et al., 2013) ou protozoários (MORAES et al., 2015), sugerindo a necessidade de desenvolver veículos nos quais nanodoses de IFN- γ possam ser adequadamente administradas.

Observa-se na literatura alguns trabalhos de SVF coloidais para citocinas, tais como, a veiculação de IFN- α para aplicações antitumorais e em vacinas por meio de lipossomas (KARAU; OETSZULAT; SHMIDT, 1996; VAN SLOOTEN et al., 2001b), micro e nanopartículas (SANCHEZ et al., 2003) e nanopartículas (SEGURA et al., 2007). Verifica-se nos resultados dos estudos citados, que o estudo do efeito da veiculação de citocinas acopladas a sistemas nanoestruturados na atividade imune de fagócitos do sangue humano não é

conclusivo. Neste contexto, o objetivo deste trabalho foi o desenvolver e caracterizar sistemas coloidais à base de NEs ou MNPs para veiculação de IFN- γ , bem como o estudo da modulação promovida por estes sistemas sobre a atividade funcional de fagócitos do sangue periférico e células de câncer de mama humano.

1.1 Motivação

1.1.1 Sistemas de veiculação de fármacos

Um sistema de veiculação de fármacos ideal tem como objetivo maximizar o efeito terapêutico, ao mesmo tempo que minimiza a toxicidade do mesmo. Com o avanço da nanociência e da nanotecnologia os procedimentos farmacêuticos têm evoluído de convencionais e simples, para sistemas altamente sofisticados, que permitem o transporte de fármacos em doses mínimas e em locais específicos, os quais são chamados de sistema de veiculação de fármacos (ANSEL et al., 2007; HONORIO-FRANÇA, et al., 2013). Os SVFs mais estudados que têm se mostrado adequados para melhorar a eficiência terapêutica incluem os sistemas coloidais, tais como os nanoparticulados e as nanoemulsões (SOLER et al., 2011; STANISÇUASKI et al., 2003).

Dispersões coloidais consistem em suspensões formadas por partículas ou moléculas, com pelo menos uma dimensão entre 1 a 1000 nm, dispersas numa fase contínua e têm despertado muito interesse nas últimas décadas. Por exemplo, as NEs são dispersões coloidais transparentes ou translúcidas, termodinamicamente instáveis e constituídas de dois líquidos imiscíveis, sendo um deles disperso na forma de pequenas gotículas (normalmente $r < 100$ nm) no

outro, cuja estabilização ocorre por meio da combinação de tensoativos (CHIME; KENECHUKWU; ATTAMA, 2014; FRYD; MASON, 2012; GUTIÉRREZ et al., 2008; MCCLEMENTS, 2012). Ao contrário das microemulsões que são termodinamicamente estáveis, as NEs apresentam estabilidade cinética e estabilidade dinâmica de longo prazo, sem floculação aparente ou coalescência (TADROS et al., 2004). A estabilidade das NEs depende dos tensoativos não-iônicos e/ou polímeros que conferem repulsão estérica entre os glóbulos, reduzindo a possibilidade de coalescência, e de separação das fases (BABOOTA et al., 2007; FERNANDEZ et al., 2004; MASON et al., 2006).

As NEs não se formam espontaneamente, mas necessitam de energia, a partir de dispositivos mecânicos ou de características químicas dos seus componentes para a sua síntese. Em adição, a concentração e a ordem de adição das fases tensoativas, oleosas e aquosas influenciam diretamente no tipo de sistema formado (FRYD; MASON, 2012). O filme formado por compostos tensoativos que compõem a interface dos sistemas emulsionados tem a função de diminuir a tensão interfacial entre os dois líquidos imiscíveis, de modo a reduzir as forças de atração entre as suas próprias moléculas, facilitar a fragmentação dos glóbulos maiores em menores e diminuir a tendência natural dos glóbulos de agregarem-se ou de coalescer (FANUN, 2010; PENG et al., 2010). Os compostos tensoativos e co-tensoativos são formados por moléculas anfifílicas com capacidade para modificar as propriedades físico-químicas da superfície ou interface dos componentes dos sistemas dos quais participam, propiciando a combinação de grandes quantidades de dois líquidos imiscíveis em uma única fase homogênea (LAWRENCE; REES, 2012; TSAI et al., 2010).

A associação de tensoativos e co-tensoativos que apresentem compatibilidade química e biológica pode ser muito efetiva no aumento da estabilidade e organização de sistemas emulsionados (LAWRENCE; REES, 2012). Por exemplo, agentes tensoativos sintéticos apresentam resultados adequados de emulsificação e conferem maior estabilidade à emulsão. Entre os tensoativos pertencentes a esta classe, os não iônicos do grupo dos poloxâmeros e polioxietileno-sorbitanos (Spans e Tweens) têm se mostrado promissores, pois levam à formação de filmes interfaciais compactos, conferindo maior estabilidade à formulação (BRUXEL et al., 2012).

Os co-tensoativos são responsáveis pela redução adicional da tensão interfacial necessária para a formação e estabilidade dos sistemas, além de promoverem fluidificação do filme interfacial formado pelo tensoativo, impedindo na maioria das vezes a elevação da viscosidade do sistema obtido. Geralmente, usa-se um álcool, embora os glicóis, as aminas e ácidos orgânicos possam desempenhar o mesmo papel (LAWRENCE; REES, 2012). Os principais co-tensoativos utilizados no preparo de emulsões são os de massa molecular pequena ou média, que apresentam uma cadeia contendo entre dois e dez carbonos. O álcool mais usado é o 1-butanol e os glicóis têm se destacado por apresentarem menores restrições de compatibilidade e toxicológicas (KREILGAARD, 2002).

Os triglicerídeos de cadeia média, principalmente o derivado cáprico, caprílico e glicerina, são aprovados para utilização parenteral pelo *Food and Drug Administration* (FDA) e preferencialmente utilizados em NEs para veiculação de fármacos por serem 100 vezes mais solúveis em água do que os triglicerídeos de cadeia longa (BENITA; LEVY, 1993).

As NEs são classificadas quanto à posição do componente da fase dispersa ou dispersante. O tipo de sistema formado dependerá da curvatura realizada pelo filme interfacial dos compostos tensoativos e co-tensoativos, onde a camada de tensoativo solvatará até certo ponto entre a fase aquosa (A) e a oleosa (O), e adotará a configuração que resulte no balanço das energias de interação coesivas das moléculas de tensoativo com o óleo e com a água (PODLOGAR et al., 2004). Quando a força de solvatação for maior para a fase oleosa, o filme de tensoativo se curvará em direção à fase aquosa formando sistemas do tipo água em óleo (A/O), conforme ilustração da Figura 1A. Caso contrário, quando a força de solvatação for maior para a fase aquosa, o filme se curvará na direção da fase oleosa formando sistemas do tipo óleo em água (O/A), conforme ilustração da Figura 1C; enquanto que, em uma situação intermediária e transitória (Figura 1B) a interface assumirá uma configuração bicontínua (CONSTANTINIDES; YIV, 1995; FERNANDEZ et al., 2004).

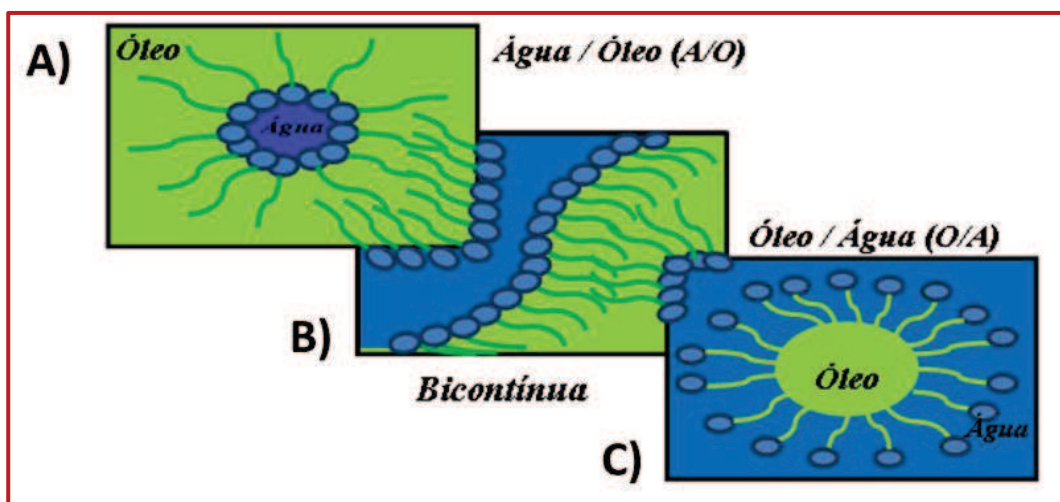


Figura 1. Ilustração das estruturas mais comuns de sistemas nanoemulsionados: A) Água em óleo (A/O); B) Bicontínua; e C) Óleo em água (O/A). Fonte: Arquivo pessoal, Adaptado de (LAWRENCE; REES, 2012).

Neste contexto, visando obter nanoemulões do tipo óleo em água com alta estabilidade e compatibilidade para veiculação de interferon gamma, foram empregados como tensoativos o Polissorbato 80 (Tween 80[®]) e o Oleato de sorbitano (Span 80[®]), co-tensoativos 1-butanol ou propilenoglicol e como fase oleosa o triglicérides de ácido cáprico/caprílico, cujas estruturas moleculares são apresentadas na Figura 2. Em A) Polissorbato 80, B) Oleato de sorbitano, C) 1-butanol, D) Propilenoglicol e E) triglicérides de ácido cáprico/caprílico.

Em comparação às formulações convencionais, as nanoestruturas poliméricas, ao serem empregadas para a veiculação de fármacos, podem aumentar a solubilidade dos componentes, reduzir a dose terapêutica e melhorar a absorção dos componentes ativos (WU; ZHANG; WATANABE, 2011). Estes sistemas podem ser utilizados para administração parenteral, pois são estáveis, não-tóxicos, não trombogênicos, ou imunogênicos, não ativam diretamente os neutrófilos e não são detectados rapidamente pelo sistema reticuloendotelial, podendo permanecer mais tempo em circulação (FARAJI; WIPF, 2009; KREUTER, 1996; SOLER et al., 2007).

As partículas e micelas nanoestruturadas diferem entre si segundo a composição e organização estrutural (Figura 3). As nanocápsulas são constituídas por um invólucro polimérico disposto ao redor de um núcleo aquoso ou oleoso, no qual o fármaco é dissolvido e/ou adsorvido à parede polimérica. Por outro lado, as nanoesferas, que não apresentam óleo em sua composição, são formadas por uma matriz polimérica, onde o fármaco pode ficar retido ou adsorvido (KUMARI; YADAV; YADAV, 2010; STANISÇUASKI et al., 2003; WU; ZHANG; WATANABE, 2011).

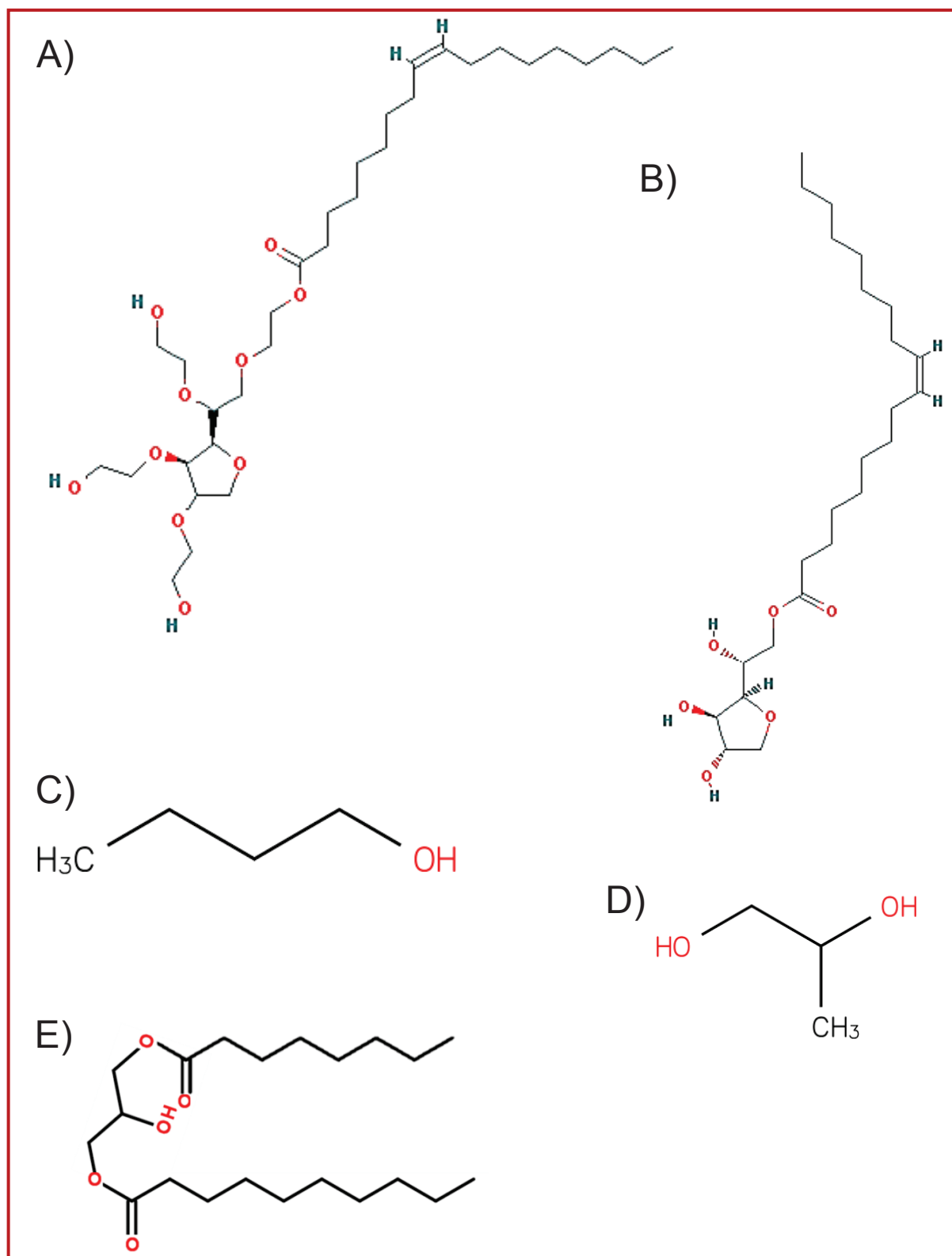


Figura 2. Estruturas moleculares dos componentes escolhidos para a síntese das nanoemulsões A) Polissorbato 80, B) Oleato de sorbitano, C) 1-butanol, D) Propilenoglicol e E) triglicérides de ácido cáprico/caprílico.

As micelas, são chamadas de sistemas autoestruturados ou *self-assemblies*, são partículas coloidais esféricas com um núcleo hidrofóbico e o exterior hidrofílico, podendo ser caracterizadas como estruturas de copolímeros em bloco montadas sobre um núcleo contendo o fármaco (BAWARSKI et al., 2008; MISHRA; PATEL; TIWARI, 2010).

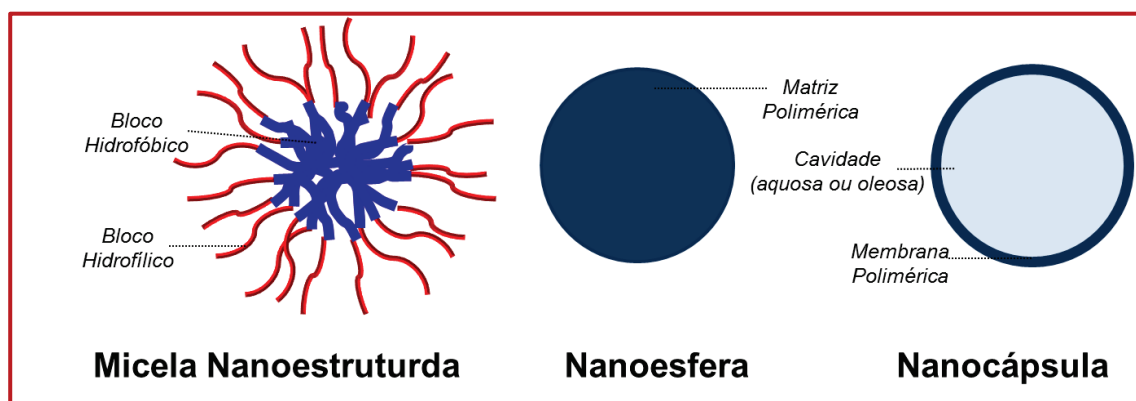


Figura 3. Ilustração de nanoestruturas na forma de micela, nanoesfera e nanocápsula, conforme indicado. Fonte: Arquivo pessoal, adaptado de (NAMBAM; PHILIP, 2012; STANISÇUASKI et al., 2003).

Existem vários métodos empregados para a preparação de nanoestruturas poliméricas, os quais podem ser de uma forma geral, baseados na polimerização *in situ* de monômeros dispersos, ou na precipitação de polímeros pré-formados (ANTON; BENOIT; SAULNIER, 2008; NAMBAM; PHILIP, 2012). Independentemente do método de preparação as estruturas são dispersas para obtenção de suspensões coloidais aquosas. Entretanto, durante o tempo de armazenamento pode ocorrer à agregação das partículas no meio, resultando na formação de precipitados. Além disso, podem ocorrer problemas de estabilidade química do polímero ou das demais matérias-primas, incluindo o fármaco (SANCHEZ et al., 2003; ZHOU et al., 2008).

Algumas características das dispersões causam dificuldades técnicas com relação à estabilidade físico-química, principalmente quando estão interagindo com uma molécula ativa. Quando se desenvolve estes sistemas é necessário avaliar o tamanho médio de partícula, distribuição de massa molecular, o potencial zeta, o pH, a interação polímero-moléculas ativas, a concentração do fármaco nas partículas e a estabilidade do coloide durante um período de tempo adequado (SOLER; PATERNO, 2015; STANISÇUASKI et al., 2003).

Micelas poliméricas à base de copolímeros têm sido investigadas para a veiculação de fármacos, tais como anti inflamatórios, analgésicos, anestésicos locais e proteínas (YAPAR; INAL, 2012). Os copolímeros em solução podem formar micelas de tamanho nanométrico, dependendo da temperatura e da concentração micelar crítica (SARAF et al., 2013). Por exemplo, os poloxâmeros (Pluronic) são tensoativos não-iônicos que têm sido muito empregados na forma de micelas nanométricas (BASAK; BANDYOPADHYAY, 2013). O Pluronic F127, é um tipo de copolímero tribloco do tipo ABA que consiste em unidades de Poli(óxido de etileno) - PEO (A = 70%) e unidades de Poli(óxido de propileno) PPO (B = 30%) que apresenta baixa toxicidade (Figura 4).

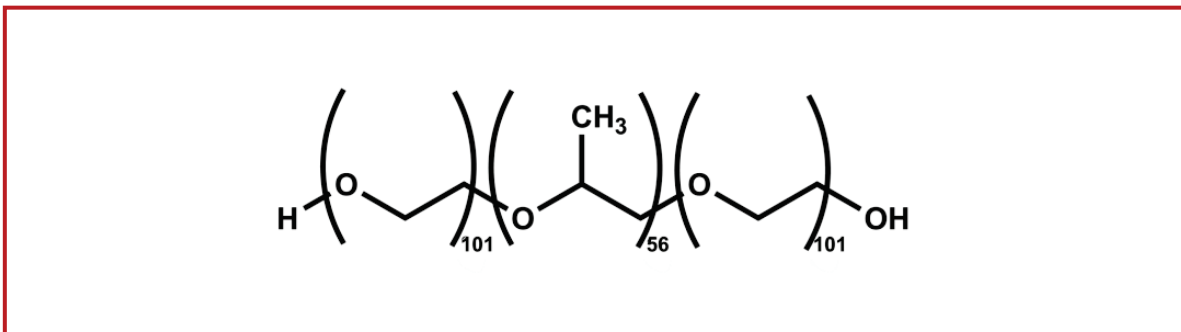


Figura 4. Estrutura molecular do copolímero Pluronic F-127.

As propriedades deste polímero dependem da temperatura, e podem ser exploradas para o desenvolvimento de novos sistemas de veiculação de fármacos (NAMBAM; PHILIP, 2012; YAPAR; INAL, 2012).

1.1.2 Interferon gamma (IFN- γ)

Os interferons são citocinas que possuem papel fundamental em mecanismos de proteção contra vírus, microorganismos e na regulação celular. Atuam como antivirais, estão envolvidos em efeitos imunomoduladores, e apresentam participação na citotoxicidade e no controle do crescimento celular (DUNN; KOEBEL; SCHREIBER, 2006; FARRAR; SCHREIBER, 1993). Os IFNs são classificados como: os de tipo I incluem o alfa e o beta, o de tipo II mais conhecido é IFN- γ e os de tipo III, são os IL-29, IL-28A e B.

O IFN- γ , ou fator de ativação de macrófagos, é uma citocina pró-inflamatória crucial na resistência a infecções, que está envolvida com: (i) os mecanismos de defesa; (ii) o estabelecimento de processos inflamatórios e autoimunidade; (iii) o controle da atividade de fagócitos, bactericidas e tumoricidas em monócitos/macrófagos; (iv) a expressão de antígenos de histocompatibilidade (MHC) classe II; (v) a produção de mediadores derivados de macrófagos tais como o TNF-alfa, IL-1, IL-12 e óxido nítrico, e (vi) a regulação negativa da síntese de mediadores antiinflamatórios tais como a IL-10 (HONÓRIO-FRANÇA et al., 2013; SANCHEZ-MUÑOZ, 2008).

O IFN- γ é produzido principalmente por células *T helper* ativadas e células NK, e possui receptores em quase todas as células, nas quais é capaz de ativar diversas respostas imunológicas. Nos tecidos, seus alvos são as células não

infectadas, macrófagos, células B em proliferação e as células T CD4+. Considera-se que esta citocina regule a expressão de diversos genes relacionados com a produção de proteínas envolvidas na criação de barreiras efetivas contra os patógenos (WILLIAMS; JURKOVICH; MAIER, 1993). Em adição, sabe-se que o IFN- γ é o principal ativador de macrófagos, o que acentua sua ação microbicida mediante a estimulação da síntese de intermediários reativos de oxigênio e do óxido nítrico como mecanismo de destruição de patógenos (FARRAR; SCHREIBER, 1993). Neste estudo, o IFN- γ foi incorporado a nanosistemas.

O IFN- γ é uma molécula de 17 kD que, na sua forma bioativa existe como um homodímero firmemente associado por numerosas interações, principalmente hidrofóbicas inter helicoidais. O IFN- γ possui um ponto isoelétrico ~ 10 , não contém ligações dissulfeto, e tem um resíduo de triptofano na posição 36 (Figura 5). Além disso, o IFN- γ humano é uma proteína α -helicoidal contendo seis hélices e nenhuma estrutura β -folha (VAN SLOOTEN et al., 2000).

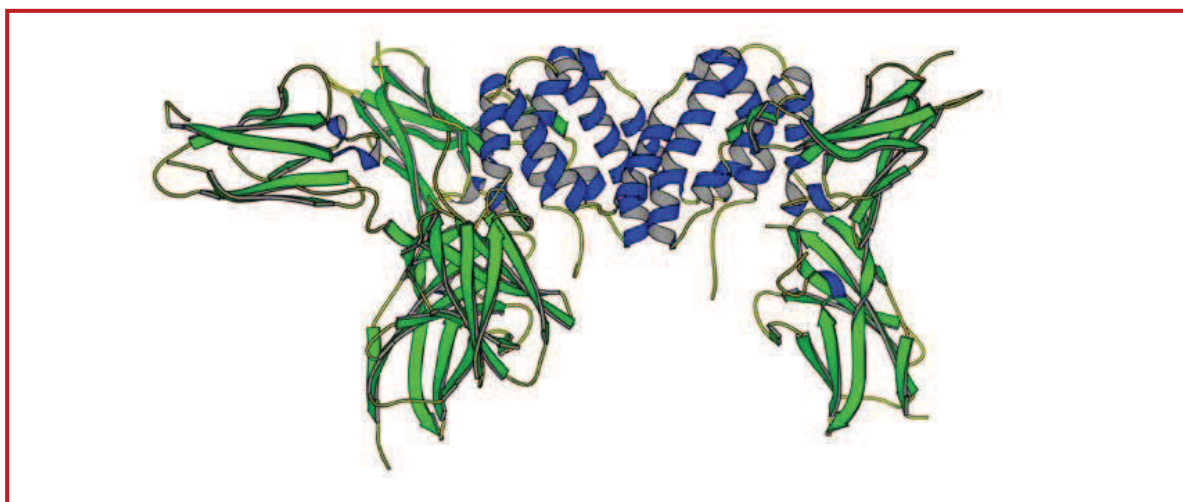


Figura 5. Esquema da estrutura cristalina do IFN- γ .
Adaptado de: <https://arginine.chem.cornell.edu/Structures/IFNcomplex.html>.

1.2 Justificativa

As dispersões coloidais se mostram promissoras para a preparação de nanosistemas não tóxicos com potenciais aplicações biológicas. A utilização dessas dispersões como sistemas de transporte de fármacos e, ao mesmo tempo, como adjuvantes na promoção da imunomodulação, representam uma nova alternativa para os tratamentos imunológicos de processos inflamatórios, alergias, infecções, câncer e outras doenças (CHRISTIAN; HUNTER, 2013; SMITH; SIMON; BAKER, 2013).

A imunomodulação é um procedimento que interfere nas funções do organismo, estimulando ou inibindo o sistema imunológico, e tem sido alvo de investigações visando diferentes terapias. Dentre os agentes imunomodulares que podem influenciar a imunidade inata e adaptativa, destaca-se o IFN- γ que tem sido empregado como agente imunoterápico. Por exemplo, trabalhos desenvolvidos mostraram que a liberação de citocinas inflamatórias com IFN- γ pode ocorrer em reações cutâneas como vasculites e exantemas, requerendo, portanto, maior investigação para que sua aplicação seja viabilizada (BILLIAU; MATTHYS, 2009).

O grupo de pesquisa do qual participo, realizou pesquisas cujos resultados mostraram que o IFN- γ em doses na faixa de 100 ng.mL^{-1} , quando administrado diluído em solução tampão, estimulou a atividade funcional de células mononucleares quando incubadas com bactérias (FAGUNDES et al., 2013), e, mais recente, para o caso de protozoários (MORAES et al., 2015).

Neste estudo, o IFN- γ será veiculado por meio de nanocarreadores, formados por sistemas coloidais, tais como nanoemulsões e micelas poliméricas

de pluronic F127. Os nanosistemas incorporados com IFN- γ têm potencial para reduzir os efeitos adversos e a dose administrada, quando comparados à administração convencional; modular as células sanguíneas e promover uma imunomodulação mais eficaz para o tratamento de doenças infecciosas e cancerígenas, quando comparado com a aplicação de sistemas em escala macroscópica.

1.3 Objetivos

Geral: Preparação e caracterização de diferentes sistemas coloidais formados por nanoemulsões ou micelas nanoestruturadas para veiculação de Interferon gamma visando sua utilização como agente imunomodulador.

Específicos:

(i) Desenvolvimento de dois tipos de nanoemulsões, sendo a primeira à base de água destilada, triglicérides de ácido cáprico-caprílico, oletado de sorbitano, polisorbato 80 e propilenoglicol, enquanto que no procedimento empregado para a segunda NE, o 1-butanol substitui o propilenoglicol empregado na primeira;

(ii) Seleção de nanoemulsões estáveis por meio de diagramas pseudoternários;

(iii) Preparação de dispersões coloidais do copolímero Pluronic F127 na forma de micelas nanoestruturadas;

(iv) Caracterização físico-química das dispersões coloidais formadas pelos dois tipos de nanoemulsões e de micelas nanoestruturadas sintetizadas;

(v) Incorporação do IFN- γ em cada um dos sistemas coloidais preparados;

(vi) Estudo da estabilidade das nanoemulsões e micelas nanoestruturadas, com ou sem a incorporação de IFN- γ ;

(vii) Avaliação da viabilidade celular relativa aos sistemas desenvolvidos;

(viii) Avaliação da modulação da atividade funcional de fagócitos do sangue periférico humano por meio dos sistemas de nanoemulsões ou de micelas nanoparticuladas contendo IFN- γ ;

(ix) Avaliação da atividade funcional de células de câncer de mama humano por meio dos sistemas de nanoemulsões ou de micelas nanoparticuladas contendo IFN- γ ;

(x) Avaliação da atividade funcional dos fagócitos sanguíneos em células tumorais quando incubados com os sistemas nanoestruturados contendo IFN- γ desenvolvidos;

Para atingir os objetivos propostos foram realizados os experimentos delineados no esquema apresentado na Figura 6.

Este trabalho está organizado da seguinte forma: o Capítulo 2 discute as técnicas de caracterização; o Capítulo 3 apresenta os procedimentos utilizados no desenvolvimento dos nanocarreadores; o Capítulo 4 mostra os detalhes dos procedimentos experimentais relacionados à síntese dos sistemas, enquanto os relativos aos ensaios biológicos estão no Capítulo 5; os resultados e as discussões são apresentados nos Capítulos 6 a 10, e no Capítulo 11, as conclusões e as perspectivas. Em anexo o trabalho publicado sobre parte dos resultados obtidos.

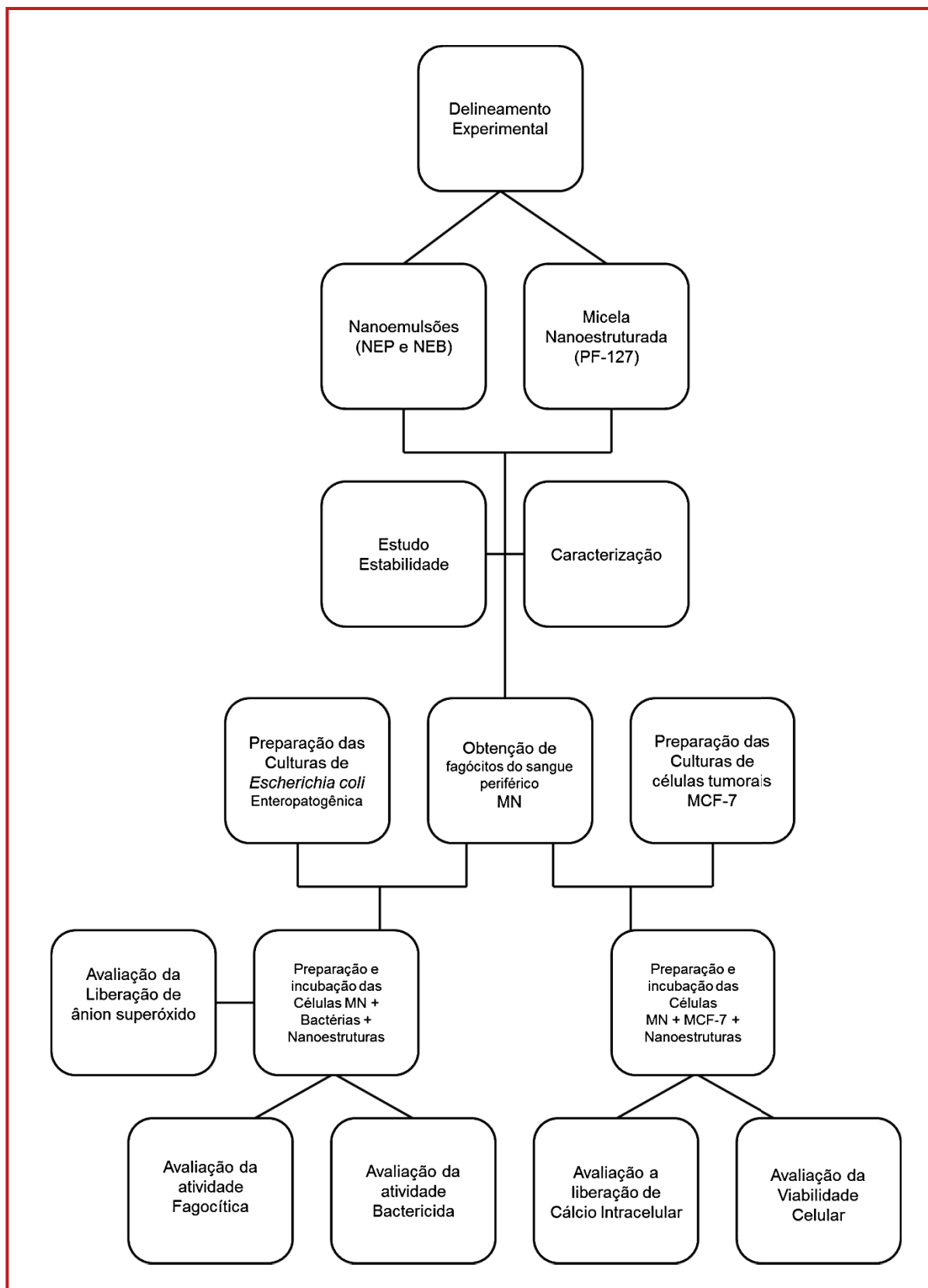


Figura 6. Esquema dos experimentos que foram realizados.

CAPÍTULO 2

2 TÉCNICAS DE CARACTERIZAÇÃO

O desenvolvimento de dispersões coloidais estáveis requer a determinação dos parâmetros físicos para o monitoramento da qualidade dos sistemas que estão sendo preparados. Neste trabalho, os parâmetros físico-químicos dos sistemas coloidais foram obtidos visando adequá-los para veicularem o IFN- γ . Dentre as técnicas que foram utilizadas neste trabalho, estão a de reologia, o espalhamento dinâmico de luz (EDL), e a dosagem via citometria de fluxo, que serão descritas a seguir e estão ilustradas na Figura 7.

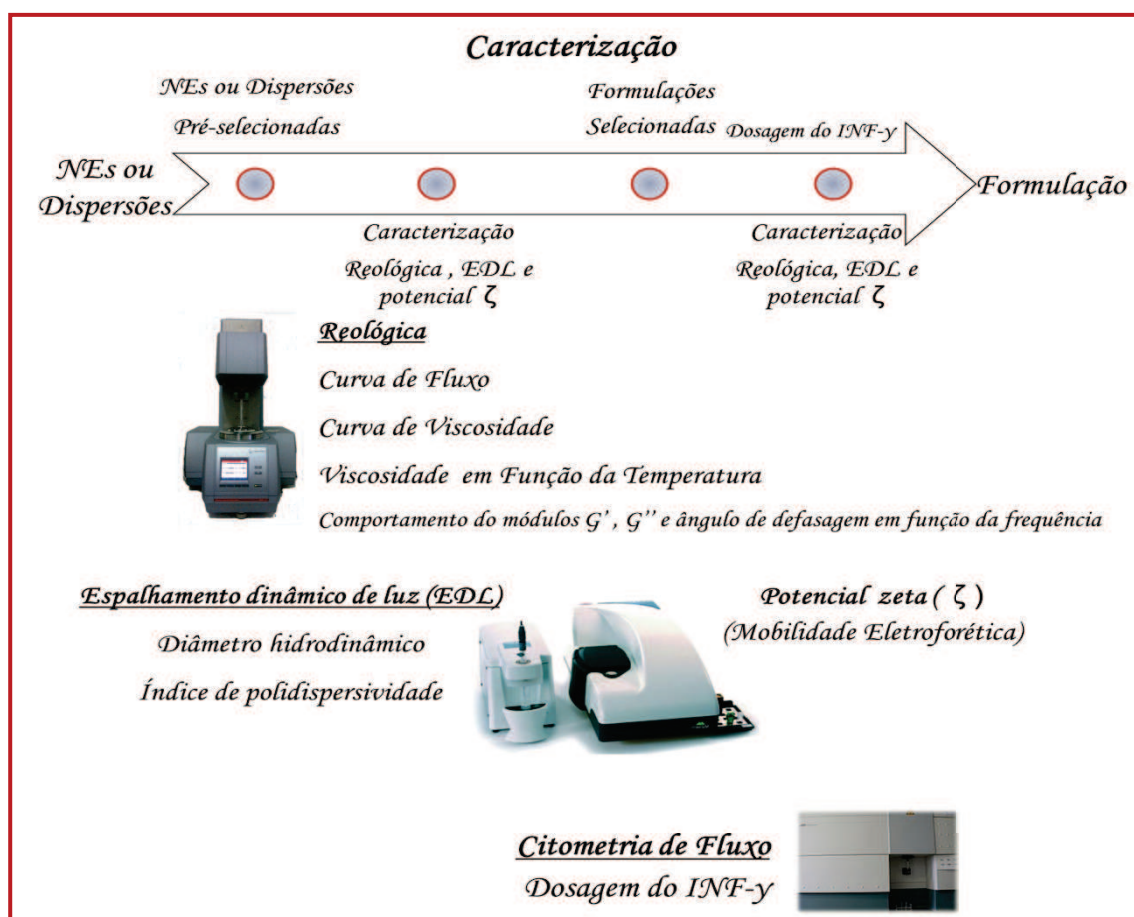


Figura 7. Ilustração das técnicas e das etapas empregadas para caracterização das NEs e MNPs desenvolvidas. (Fonte: Arquivo pessoal).

2.1 Reologia

A reologia estuda o comportamento deformacional e o fluxo de matéria de um determinado corpo sob influência de uma tensão, em determinadas condições termodinâmicas, e ao longo de um intervalo de tempo (SCHRAMM, 2000). A reologia tem sido um dos métodos aplicados para caracterização de sistemas micro e nano estruturados, pois o comportamento de um fluido está diretamente relacionado com o tipo e o grau de organização do sistema (PESSOA et al., 2014; RIBEIRO et al., 2015). Os ensaios reológicos permitem o estudo das propriedades de escoamento e deformação de um corpo, este por sua vez pode ser líquido, sólido ou um gás. A maioria dos líquidos apresenta um comportamento reológico com perfil de fluxo intermediário entre os líquidos e os sólidos, podendo ser denominados de viscoelásticos (ANSEL; POPOVICH; ALLEN JR, 2007).

A viscosidade é a propriedade física de um líquido apresentar resistência ao fluxo induzido pelo cisalhamento (SCHRAMM, 2000). Quanto maior for a viscosidade, menor será a velocidade com que o fluido se movimenta (MARTIN; SINKO; SINGH, 2011). Newton descreveu o comportamento de fluxo de um líquido ideal, com base na viscosidade (η), na tensão de cisalhamento (τ) e na taxa (γ) de cisalhamento (SCHRAMM, 2000), por meio da equação: $\tau = \eta \cdot \gamma$. A dependência da tensão de cisalhamento com a taxa de cisalhamento típica, que define o comportamento de fluxo de um líquido e a curva da viscosidade η correspondente, são dadas em função da taxa de cisalhamento.

O fluxo Newtoniano apresenta uma viscosidade constante, independente da força aplicada para uma dada temperatura. Quando o comportamento de um

líquido ideal, em determinadas condições de tensão ou taxa de cisalhamento é linear ele é denominado fluido Newtonianos (RIBEIRO et al., 2015; SUBRAMANIAN et al., 2005). Sistemas nanométricos emulsionados geralmente apresentam comportamento de fluidos Newtonianos e sua viscosidade é comparada à de líquidos ideais, até mesmo em elevadas concentrações de gotículas, provavelmente devido à coalescência reversível (MAHDI et al., 2011).

A correlação entre tensão de cisalhamento e taxa de cisalhamento que define um fluido Newtoniano é mostrada na Figura 8, enquanto a curva de viscosidade η correspondente pode ser observada na Figura 8B.

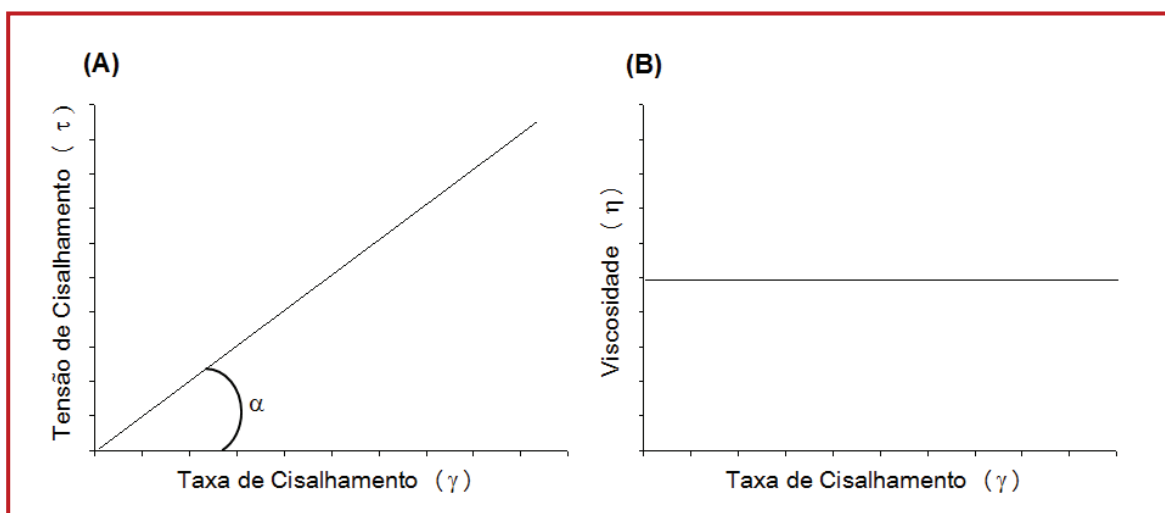


Figura 8. Curva de fluxo (A) e de viscosidade (B) de um líquido Newtoniano. Fonte: Arquivo pessoal, adaptado de (SCHRAMM, 2000).

Os fluidos que não apresentam linearidade de fluxo, não-Newtonianos, se caracterizam por apresentar alterações da viscosidade com o aumento da taxa de cisalhamento, e se subdividem em três categorias: líquido pseudoplástico, líquido dilatante e líquido plástico (de Bingham) ou pseudoplástico com limite de escoamento (MARTIN; SINKO; SINGH, 2011; SCHRAMM, 2000).

Os líquidos pseudoplásticos apresentam diminuição drástica da viscosidade quando a taxa de cisalhamento aumenta. Por outro lado os líquidos dilatantes são fluidos nos quais a viscosidade aumenta com a taxa de cisalhamento (SCHRAMM, 2000). Os líquidos plásticos se comportam como um sólido em condições estáticas ou de repouso e após aplicação de uma certa tensão de deformação começam a fluir, e a partir deste ponto podem apresentar comportamento newtoniano, pseudoplástico ou dilatante. (MARTIN; SINKO; SINGH, 2011; SCHRAMM, 2000). Os perfis das curvas de fluxo e viscosidade de fluidos não-Newtonianos podem ser observados na Figura 9.

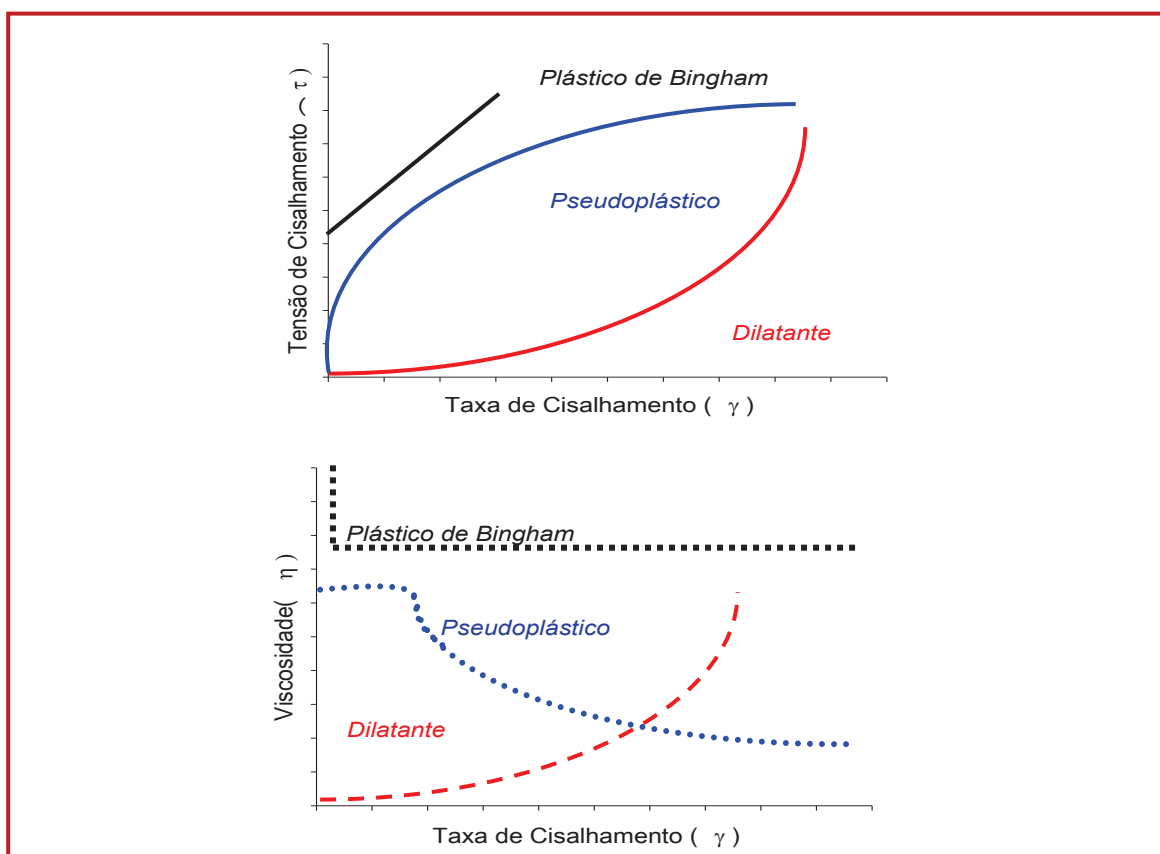


Figura 9. Exemplos de curvas de fluxos de líquidos Não-Newtonianos. As curvas em preto se referem a plástico de Bingham; em azul a pseudoplástico e em vermelho a dilatante. Fonte: Arquivo pessoal, adaptado de (SCHRAMM, 2000).

Quando o sistema apresenta comportamento com características de sólido após o aumento da deformação, a estrutura destes sistemas viscoelásticos complexos pode ser obtida por meio de análises reológicas a partir da aplicação de um teste de solitação oscilatória. Neste tipo de ensaio, a tensão de cisalhamento varia como uma frequência senoidal e a relação entre a tensão de cisalhamento aplicada e a deformação resultante fornece informações sobre os tipos de resposta (elástica ou viscosa) do sistema. A partir da razão destas duas grandezas, obtém-se o módulo elástico complexo G^* , dado por (SCHRAMM, 2000).

$$G^* = G' / iG'' \quad (1)$$

Onde G' é o módulo de armazenagem, $i = \sqrt{-1}$ (nivelamento numérico Gaussiano) e G'' é o módulo de perda.

No ensaio oscilatório de corte impõe-se uma deformação periódica sinusoidal de baixa amplitude (γ_a), dada por:

$$\gamma(t) = \gamma_a \text{sen} \omega t \quad (2)$$

Onde γ é a deformação, γ_a é a amplitude da deformação, $\text{sen} \omega$ corresponde a uma velocidade angular e t é o tempo.

E observa-se a resposta em função da tensão de cisalhamento:

$$\tau(t) = \tau_a \text{sen}(\omega t + \delta) \quad (3)$$

Onde τ é a tensão, τ_a é a amplitude da tensão, $\text{sen} \omega$ corresponde a uma velocidade angular, t é o tempo e δ o ângulo de fase.

Quando se considera que as componentes da tensão estão defasadas de 90° ou em fase, em relação à deformação imposta, definem-se duas quantidades proporcionais à viscosidade e à elasticidade dos fluidos, respectivamente. Assim, o módulo de elasticidade (G'):

$$G' = \tau_a / \gamma_a \cos \delta \quad (4)$$

Onde G' é o módulo de armazenagem, τ_a é a amplitude da tensão e γ_a é a amplitude da deformação e $\cos \delta$ corresponde ao ângulo de fase.

Se refere à energia de deformação armazenada reversivelmente, enquanto que o módulo de viscosidade (G''):

$$G'' = \tau_a / \gamma_a \sin \delta \quad (5)$$

Onde G'' é o módulo de perda, τ_a é a amplitude da tensão e γ_a é a amplitude da deformação e $\sin \delta$ corresponde ao ângulo de fase.

Representa a energia cedida irreversivelmente pela amostra de fluido ao exterior, constituindo assim uma característica do comportamento viscoso.

O fator de perda $\tan \delta$ é definido como o quociente entre os dois módulos:

$$\tan \delta = G'' / G' \quad (6)$$

Onde G'' é o módulo de perda e G' é o módulo de armazenagem.

Em resumo, a componente real do módulo elástico, G' , é denominada de módulo de armazenagem, porque representa a energia armazenada durante a deformação, enquanto a parte imaginária do módulo, G'' , se refere ao elemento viscoso que não pode armazenar energia, porque a tensão aplicada é dissipada na forma de deformação irreversível (OSTERHOLD, 2000; SHAHRIVAR;

VICENTE, 2014). Portanto é possível avaliar a evolução temporal dos módulos de armazenagem (G') e perda (G'') em função da frequência da tensão de cisalhamento. Quando se observa a ausência do termo G' e a predominância de G'' as amostras comportam-se praticamente como um sistema líquido viscoso. Esse comportamento é característico de soluções líquidas uma vez que G' e G'' apresentam uma dependência linear com a frequência. Por outro lado, quando G' está presente, mas com valores bem inferiores a G'' , a amostra comporta-se como um líquido essencialmente viscoso constituído de uma rede fracamente estruturada apresentando propriedades viscoelásticas (SCHRAMM, 2000; SHAHRIVAR; VICENTE, 2014). Quando o número de interações elásticas aumenta, fazendo com que os valores de G' sejam maiores do que os de G'' , o sistema caracteriza-se como sólido com característica predominantemente elástica (FORMARIZ et al., 2006). É difícil quantificar a viscosidade e a elasticidade a baixas frequências e determinar o comportamento reológico destas formulações. Porém, a análise do ângulo de defasagem, (\tan) dado pela razão entre G'' e G' , possibilita quantificar a viscoelasticidade do sistema (OSTERHOLD, 2000). Quando \tan é maior que 1, tem-se $G'' > G'$ e o material tem um comportamento semelhante a um líquido viscoso e quando $\tan < 1$, $G'' < G'$ e o comportamento é de um sólido elástico (XU; KOELLING, 2005).

Neste trabalho todos os sistemas foram avaliados quanto aos parâmetros de fluxo, área de histerese e viscosidade à temperatura de 25°C ou em função da temperatura. As dispersões coloidais que apresentaram características elásticas elevadas foram avaliadas quanto à viscoelasticidade em função da frequência. Estas análises foram realizadas empregando-se o equipamento Modular Compact Rheometer - MCR 102 (Anton Paar®).

2.2 Espalhamento dinâmico de luz (EDL)

A técnica de espalhamento dinâmico de luz, do inglês *Dynamic light scattering* (DLS), leva em conta o movimento browniano dos aglomerados e o relaciona com o tamanho dos mesmos, visto que os agregados sob incidência de luz são sistemas que possuem movimentos de rotação, translação e vibração. A luz espalhada no detector encontra-se em constante mudança, variando com o tempo (AGIMELEN et al., 2015).

No procedimento experimental de espalhamento de luz, um feixe de luz monocromático incide na amostra sendo espalhada em várias direções, um detector irá coletar a luz espalhada em um ângulo θ , considerando como referência o feixe incidente (WASHINGTON, 1992). A técnica permite obter o diâmetro hidrodinâmico (D_H) dos agregados que compõem o coloide, o qual leva em conta a presença da cobertura na sua superfície, bem como a interação desta com o meio. As medidas foram obtidas empregando-se o equipamento Zetasizer Nano Z90 (Malvern Instruments, Worcestershire, Reino Unido), com excitação em 632.8 nm.

2.3 Potencial Zeta

O potencial zeta (ζ) representa o potencial no plano de cisalhamento resultante da interação das cargas das micro ou nanopartículas com as do meio. A carga superficial das partículas gera uma bicamada elétrica devido à distribuição dos contra-íons ao redor da partícula. Esta bicamada é modelada considerando-se duas partes: a interna onde os contra-íons encontram-se fortemente ligados às partículas e a externa onde ocorre uma difusão dos

mesmos. Com o movimento dessas partículas, os contra-íons da camada interna se deslocam juntamente com a partícula, entretanto o mesmo deslocamento não ocorre com as cargas da camada difusa. O potencial ζ é a medida do potencial que existe entre as duas partes da bicamada (HONARY; ZAHIR, 2013).

A determinação do potencial ζ é feita através dos efeitos eletrocinéticos provocados pela interação entre a carga superficial das partículas e um campo elétrico aplicado ao meio, da mesma forma que acontece na eletroforese onde, as partículas com carga tendem a se mover em direção ao eletrodo de carga oposta, entretanto, as forças viscosas do meio se opõem a esse movimento. Quando o equilíbrio entre essas forças é atingido, a velocidade das partículas é constante. Esta velocidade é chamada de mobilidade eletroforética (UE) e é relacionada com o potencial ζ conforme a equação de Henry (EHLERS; HEINÄMÄKI; YLIRUUSI, 2012). O potencial ζ , reflete a estabilidade de um coloide, e para que este seja considerado estável, o valor absoluto do potencial ζ deve ser maior ou igual à 30 mV (PERCORA, 1985). Esta medida foi realizada no mesmo equipamento empregado para a técnica EDL.

2.4 Citometria de Fluxo

O citômetro de fluxo é muito empregado como ferramenta de análise laboratorial de células sanguíneas e vegetais, culturas microbianas (TIDWELL et al., 2015), e também para a dosagem de proteínas (SIMARD; CLOUTIER; NÉRON, 2014), avaliação de partículas (SCHERER et al., 2011), bem como outras aplicações. O aparelho é constituído basicamente por 5 elementos: fonte de radiação que pode ser uma lâmpada de mercúrio ou laser, uma câmara de

fluxo, filtros ópticos para seleção de um intervalo de comprimento de onda específico, fotomultiplicadores para a detecção sensível e unidade de processamento dos sinais (SILVA et al., 2004).

A suspensão celular a ser analisada é injetada e atravessa uma câmara onde ocorre a passagem célula por célula. A passagem individual das células é obtida a partir do fluxo hidrodinâmico da amostra, sendo esta injetada juntamente com a solução salina que também atravessa a câmara. As modificações ocorridas no feixe de luz devido à presença das células são então detectadas por sensores, dessa forma a luz dispersa frontalmente é coletada por um sistema óptico que identifica as células pelo seu tamanho e granularidade interna (SILVA et al., 2004; SIMARD; CLOUTIER; NÉRON, 2014). A figura 10 apresenta um esquema do funcionamento do citômetro de fluxo e sistema de leitura.

Quando a luz é dispersa lateralmente avalia-se a fluorescência. Neste caso, emprega-se os fluorocromos, que são marcadores de antígenos que absorvem a luz e a emitem num comprimento de onda maior e específico para cada antígeno, sendo assim cada fluorocromo possui um padrão espectral de absorção e emissão distinto, de tal maneira que até três cores de luz podem ser opticamente separadas por filtros seletivos encontrados no interior dos citômetros (BERTHO; SANTIAGO; COUTINHO, 2000). Em adição, a emissão de luz gerada pelas células e anticorpos monoclonais associadas aos fluorocromos atingem detectores específicos e são convertidos em impulsos elétricos. Estes impulsos são convertidos em sinais digitais que fornecem resultados em diferentes formas para análise tais como histogramas, *dot-plot*, tabelas, entre outros (SILVA et al., 2004; SIMARD; CLOUTIER; NÉRON, 2014; TIDWELL et al., 2015).

A aquisição e análise dos dados foram realizadas no Citômetro de Fluxo FACSCalibur (BD, San Jose, USA).

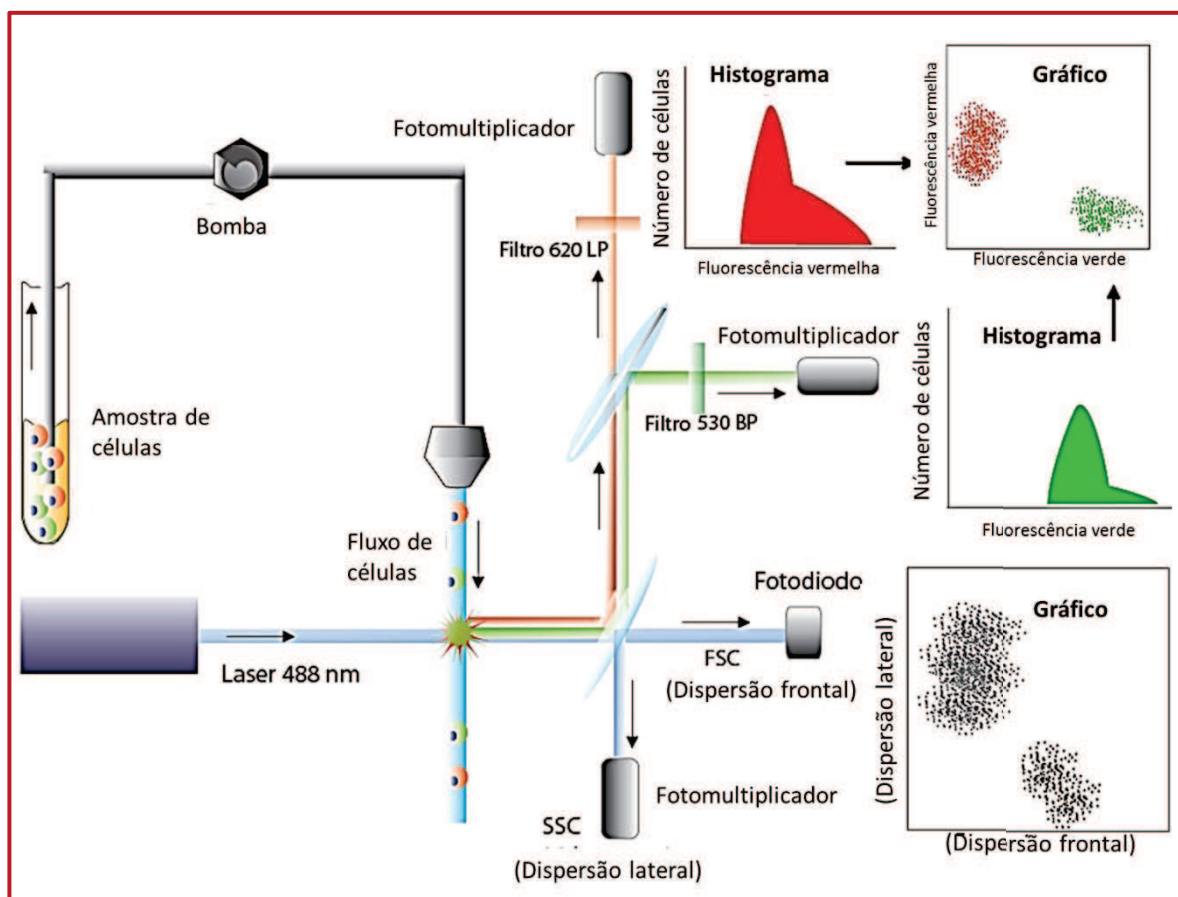


Figura 10. Ilustração dos componentes do citômetro de fluxo e do sistema de leitura. Fonte: <http://gic.casaccia.enea.it/images/Citometro.jpg>.

CAPÍTULO 3

3 SÍNTESE DOS NANOCARREADORES

Neste capítulo estão descritos os procedimentos experimentais empregados na síntese dos nanocarreados, iniciando com a preparação dos sistemas nanoemulsionados, e em seguida a síntese das dispersões coloidais formadas por micelas de pluronic, e a incorporação do interferon gamma.

3.1 Materiais

As formulações foram preparadas com água destilada, e os reagentes triglicérides de ácido cáprico/caprílico - Polymol 812[®], EHL= 10,8 (Henrifarma[®]), Oletado de sorbitano - Span 80[®] (SP), EHL = 4,3 (Sigma[®]), Polissorbato 80 - Tween 80[®] (TW) - EHL = 15,0 (Sigma[®]) e Propilenoglicol (Henrifarma[®]) ou 1-butanol (Vetec[®]), copolímero Pluronic F127 (Sigma[®]), e o Interferon Gamma Humano (Sigma[®]), foram utilizados sem modificações.

3.2 Preparação dos sistemas nanoemulsionados

Os sistemas nanoemulsionados foram desenvolvidos por meio da técnica de ultra homogeneização (DONSÌ et al., 2012) com algumas adaptações, utilizando-se o equipamento Ultra-Turax (IKA[®]). A avaliação das proporções dos componentes da formulação foi realizada por meio da construção de diagramas pseudoternários (CHIME; KENECHUKWU; ATTAMA, 2014). Dois sistemas NEs foram desenvolvidos empregando-se os co-tensoativos, propilenoglicol (P) ou 1-butanol (B).

A concentração adequada dos tensoativos para o desenvolvimento dos sistemas NEs foi determinada por meio do estudo do equilíbrio hidrófilo lipófilo (EHL) requerido pela fase oleosa, que no caso é o triglicérides de ácido cáprico/caprílico - Polymol 812[®] (EHL igual a 10,8), com o objetivo de obter sistemas de tensoativos com valores de EHL iguais ao da fase oleosa, o que resulta numa maior estabilidade da emulsão. Os co-tensoativos foram empregados na razão de 10 % (m/m) da fase de tensoativo (RIBEIRO et al., 2015), valor este, empregado para a construção dos diagramas.

As proporções dos componentes das amostras foram definidas por meio da construção de diagramas pseudoternários utilizando-se o programa SigmaPlot 8.0, nos quais o vértice superior representa 100 % (m/m) da mistura tensoativo/co-tensoativos, o inferior direito 100 % (m/m) de fase oleosa e o inferior esquerdo 100 % (m/m) de fase aquosa.

Para o desenvolvimento dos sistemas nanoemulsionados foram utilizadas quantidades pré-estabelecidas dos componentes, onde a concentração de cada fase tensoativa, oleosa e aquosa, respectivamente, variou de 10 a 80 % (m/m), conforme o diagrama de *pontos pré-determinados*, onde cada ponto representa uma mistura preparada (Figura 11). Em seguida, cada uma das misturas, formada por tensoativos, óleo e água, foi submetida ao processo de ultra homogeneização gradual partindo de 5.000 rpm.mim⁻¹ até o máximo de 24.000 rpm.mim⁻¹, resultando em 36 amostras preparadas para cada um dos sistemas desenvolvidos.

Em uma primeira etapa, cada um dos lotes com 36 amostras foi classificado visualmente, após permanecer 72 h armazenado a 25°C e as amostras correspondentes a cada um dos pontos rotuladas como nanoemulsão

(NE) no caso dos sistemas translúcidos, emulsão gel (EG), emulsão líquida (EL) os sistemas opacos dependendo da consistência, e como separação de fases (SF) os heterogêneos, de forma a confeccionar o diagrama de *classificação dos pontos* (Figura 11). Em seguida, amostras foram preparadas para realização das titulações aquosas de razões de massa de mistura de tensoativos/fase oleosa de 1:9 até 9:1 (m/m) sob agitação, com o objetivo de se obter as regiões delimitantes no diagrama, o que permitiu determinar as áreas das diferentes regiões e a estabilidade. A titulação foi realizada com acréscimos de água destilada em quantidades de 0,05 mL a 0,1 mL até a separação de fases, sendo que durante o processo as misturas passaram por agitação mecânica e manual. Após a homogeneização de cada volume do titulante as formulações foram classificadas visualmente, seguindo o critério mencionado. Posteriormente foram selecionadas no *diagrama de regiões* (Figura 11), as formulações com características translúcidas. A ilustração do sistema preparado O/A, bem como a imagem de uma de NE selecionada se encontram na parte inferior da mesma figura.

A partir da obtenção dos respectivos diagramas pseudoternários, foi possível delimitar as regiões de domínios e determinar a concentração dos componentes dos sistemas que se enquadram na região corresponde à de NE. Nesta região foram pré-selecionados pontos distribuídos em retas que cortam todo seguimento da região translúcida, de forma a selecionar amostras representativas desta região, as quais apresentam sistemas com característica de NEs. As formulações selecionadas foram empregadas para preparar as amostras com adição de interferon e posterior caracterização.

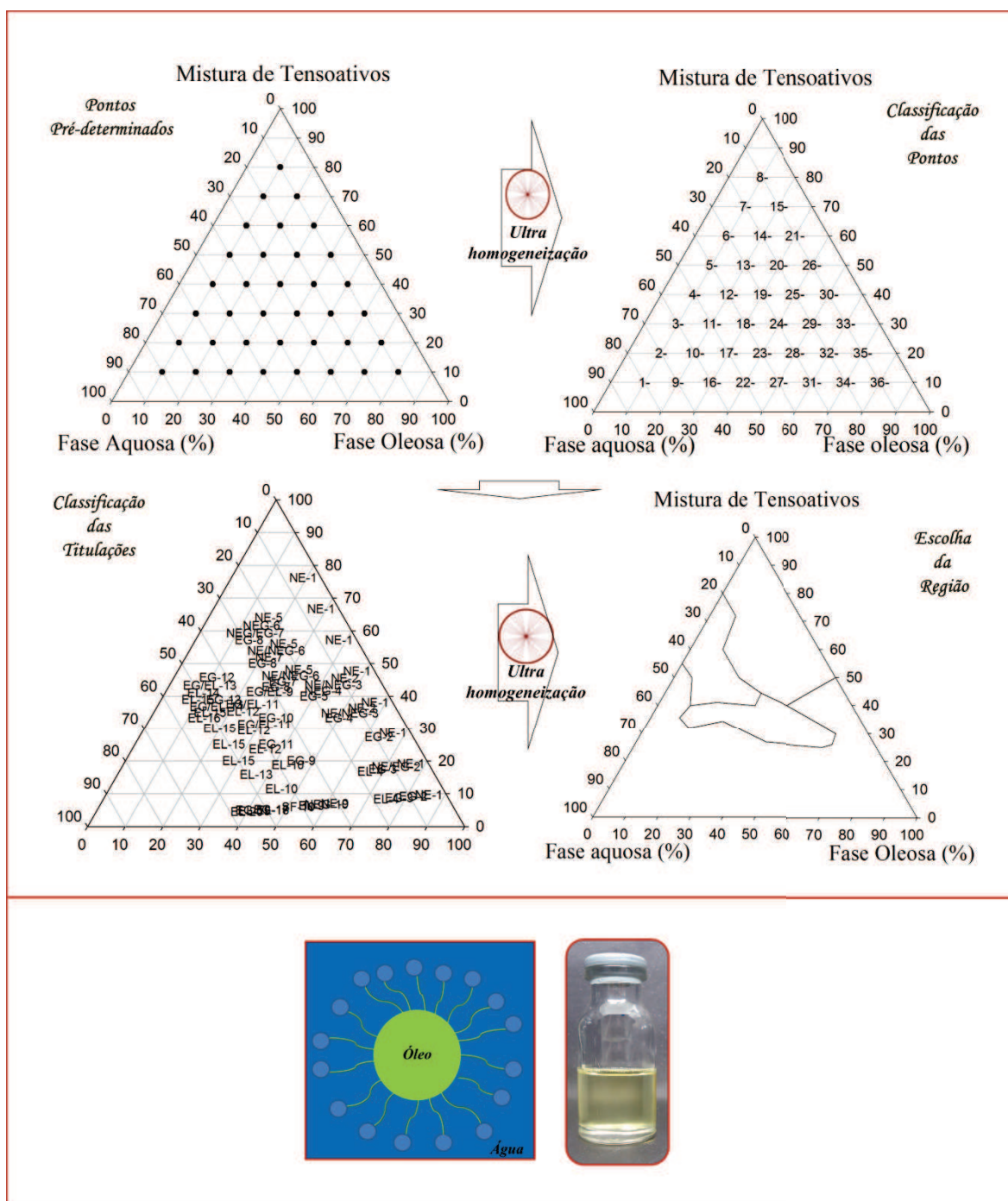


Figura 11. Ilustração do processo da síntese das NEs por meio do método de ultrahomogeneização e definição das proporções dos componentes empregando diagramas pseudoternários. Cada ponto se refere a uma amostra preparada. A ilustração do sistema preparado O/A, bem como a imagem de uma de NE selecionada se encontram na parte inferior da Figura. (Fonte: Arquivo pessoal).

3.3 Preparação dos sistemas coloidais com micelas nanoestruturadas

Os sistemas coloidais contendo as micelas poliméricas foram formulados com o uso de tampão fosfato 7,4 (PBS) e do copolímero Pluronic F127 (F127) nas concentrações de $10 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$, $50 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ e $250 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$, cujas amostras foram denominadas F127-10, F127-50 e F127-250, respectivamente. As soluções foram preparadas e mantidas *overnight* a 5°C para completa homogeneização (Figura 12).

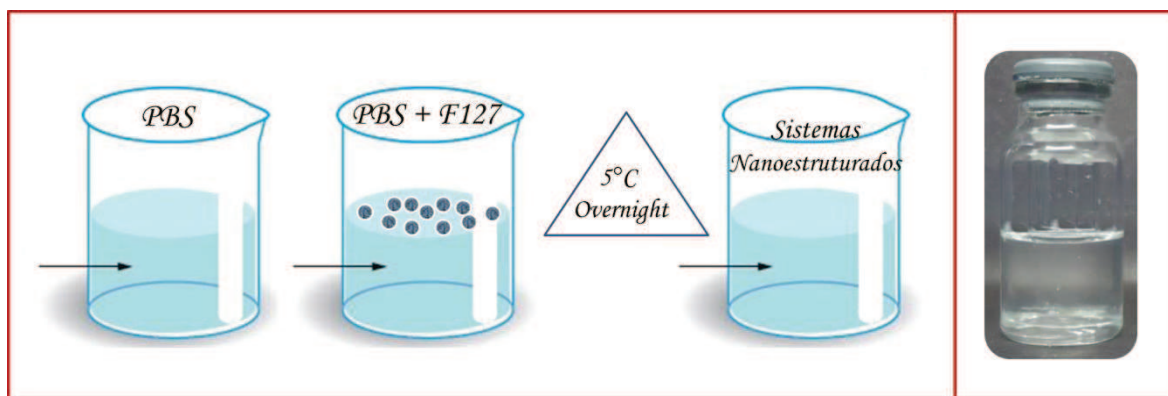


Figura 12. Ilustração do processo da síntese das MNPs por meio do método autoestruturante. A imagem da direita se refere a uma das amostras preparadas. (Fonte: Arquivo pessoal).

3.4 Preparação dos sistemas com a incorporação de IFN- γ

A solução aquosa de IFN- γ foi adicionada em volume equivalente da fase aquosa durante a preparação das nanoemulsões e das micelas coloidais, sob agitação, adicionando-se em seguida as fases de tensoativo e oleosa ou F127, respectivamente. Cada sistema foi formulado de forma a obter uma dispersão final com concentração de IFN- γ da ordem de $100 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$.

As formulações NEs após a incorporação do IFN- γ foram denominadas NEPIFN- γ , para as que contêm propilenoglicol e NEBIFN- γ para as de 1-butanol. As MNPs de Pluronic, após a incorporação do IFN- γ foram denominadas F127-10IFN- γ , F127-50IFN- γ e F127-250IFN- γ , em função da concentração de F127 empregada.

Neste estudo foram preparadas em média dez amostras de cada formulação dos dois lotes de NEs, sendo que, no caso dos dois sistemas de nanoemulsões (NEP e NEB) com ou sem a incorporação de IFN- γ ; as amostras foram rotuladas de 1 a 9NEP e 1 a 9NEPIFN- γ ; e 1 a 13NEB e 1 a 13NEBIFN- γ , respectivamente. No total foram produzidas cerca de 160 e 230 amostras relativas aos sistemas NEP e NEB, respectivamente. No caso dos carreadores formados por micelas de F127, (MNPs) também foram preparadas 9 amostras, para cada uma das três concentrações do copolímero, bem como as correspondentes após a incorporação de IFN- γ (F127-10, F127-50, F127-250, F127-10IFN- γ , F127-50IFN- γ e F127-250IFN- γ) totalizando cerca de 50 amostras.

CAPÍTULO 4

4 PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS EMPREGADOS NA CARACTERIZAÇÃO E CONTROLE DE QUALIDADE DOS MATERIAIS SINTETIZADOS

A preparação de sistemas nanoestruturados coloidais para veiculação de fármacos requer que eles, além das características necessárias para ancorar o fármaco, apresentem estabilidade por certo período de tempo. Neste capítulo, são introduzidas as técnicas e procedimentos que foram utilizados para o desenvolvimento dos sistemas coloidais formados por nanoemulsões e micelas nanoparticuladas, bem como as etapas do procedimento nas quais as técnicas de caracterização foram utilizadas como ferramenta para otimização do preparo e o estudo da estabilidade.

4.1 Caracterizações Reológica

As curvas de fluxo e viscosidade foram obtidas com os parâmetros estabelecidos variando-se a tensão de cisalhamento (τ) de 0 a 5 Pa para a curva ascendente e de 5 a 0 Pa para a curva descendente. Estes ensaios foram realizados em condições isotérmicas a 25°C, com 75 leituras por análise.

A partir dos dados da curva de fluxo, tensão de cisalhamento em função da taxa de cisalhamento, de cada amostra é possível determinar a área de histerese, que representa os níveis de diferença entre a curva ascendente e a descendente do reograma. Valores obtidos para a área de histerese entre 0 e ± 1 Pa.s indicam fluxo newtoniano, enquanto que valores menores do que -1 Pa.s indicam fluxo não-newtoniano com tixotropia do tipo reopéxico e valores maiores que +1 Pa.s indicam fluxo não-newtoniano com tixotropia do tipo pseudoplástico.

O comportamento da viscosidade em função da temperatura foi obtido com os parâmetros estabelecidos, para o valor da tensão de cisalhamento (τ) igual a 1 Pa, variando-se a temperatura de $5 \pm 0,1$ a $45 \pm 0,1^\circ\text{C}$, com taxa de aquecimento de $1^\circ\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$. Os dados foram registrados a cada $1,0 \pm 0,1^\circ\text{C}$ totalizando 41 leituras por análise.

Os ensaios de viscoelasticidade em função da frequência da tensão de cisalhamento (τ) foram realizados com uma amplitude de tensão oscilatória igual a 0,5 Pa, variando-se a frequência na faixa de 100 a 0.1Hz.

Os experimentos foram realizados depositando-se 600 μL das formulações sobre a superfície da placa de leitura. As leituras foram realizadas com controle permanente do gap de medida com suporte TruGap™ em 0,099 mm, célula de medida Toolmaster™ CP 50 e controle da temperatura com recurso T-Ready™, utilizando-se o Software Rheoplus V3.61. Os dados obtidos foram tratados empregando o mesmo Software e as linhas internas dos gráficos são apenas linhas guias para facilitar a visualização.

4.2 Caracterização por espalhamento dinâmico de luz

As análises EDL das suspensões coloidais das formulações preparadas forneceram os dados do diâmetro hidrodinâmico do sólido disperso, e o índice de polidispersividade. As nanoemulsões foram preparadas a partir de uma diluição 10:1000 da formulação em água destilada, enquanto a dispersão coloidal micelar foi utilizada sem diluições, sempre utilizando água destilada como referência. As mesmas amostras foram utilizadas para obter os dados de potencial zeta.

4.3 Controles de qualidade e caracterizações físico-químicas

Com a obtenção de parâmetros físico-químicos foi possível testar a adequação dos sistemas formulados, e realizar a caracterização dos mesmos. Os resultados para os parâmetros de qualidade das formulações foram obtidos 24 h após a preparação, e ao final dos ciclos de tratamentos, em amostras em triplicatas.

Centrifugação: Quando os sistemas são centrifugados o estresse gravitacional aumenta a colisão entre as partículas e altera o equilíbrio dinâmico, sendo possível obter informações sobre a estabilidade dos sistemas formulados. As alíquotas foram centrifugadas a $384 \times g$ durante 30 minutos, em centrífuga comum mantida em ambiente a 25°C e em centrífuga refrigerada a 5°C . As amostras que apresentaram pontos com heterogeneidade visual foram excluídas.

Determinação do pH: As dispersões tiveram o pH medido com o objetivo de avaliar possíveis decomposições. Foi utilizado o pHmetro (DEL Lab[®]) aferido com solução padrão de $\text{pH} = 7$ e $\text{pH} = 4$, por meio da inserção do eletrodo diretamente na amostra.

Determinação da condutividade elétrica: A condutividade elétrica foi avaliada inserindo-se o eletrodo diretamente na amostra com o objetivo de identificar o tipo de sistema (água em óleo, A/O, ou óleo em água, O/A) e possível tendência à inversão de fases. O equipamento utilizado foi um condutivímetro (LIDA[®]) calibrado com solução de $\text{KCl } 0,1 \text{ mol.L}^{-1}$.

4.4 Estudos de Estabilidade

Os estudos de estabilidade preliminar e acelerada foram adaptados da metodologia de (RIBEIRO et al., 2015).

Estabilidade Preliminar: Os sistemas foram divididos em 2 grupos, sendo que, um dos quais foi aquecido a $40 \pm 1^\circ\text{C}$ e o outro resfriado a $5 \pm 1^\circ\text{C}$. Os sistemas passaram por ciclos alternados de $5 \pm 1^\circ\text{C}$ ou $40 \pm 1^\circ\text{C}$ por 24 h completando os ciclos ao 14º dia. Após os tratamentos foi possível identificar os sistemas homogêneos.

Estabilidade Acelerada: Este estudo avaliou os sistemas selecionados após os tratamentos de estabilidade preliminares visando o desenvolvimento de formulações estáveis. Os sistemas foram submetidos a condições extremas por um período maior do que o do primeiro teste. Foram divididos em três grupos e submetidos a tratamentos térmicos com temperaturas de: $40 \pm 1^\circ\text{C}$, $25 \pm 1^\circ\text{C}$ ou $5 \pm 1^\circ\text{C}$, continuamente por um período de 90 dias com a mesma temperatura. As formulações foram submetidas às análises físico-químicas, aferição dos perfis reológicos, do potencial zeta e do diâmetro hidrodinâmico a cada 45 dias. A Figura 13 apresenta uma ilustração das etapas e avaliações realizadas nos estudos de estabilidade.

Dosagem do IFN- γ nas formulações: As concentrações de IFN- γ nas formulações durante o estudo de estabilidade acelerada foram determinadas por Citometria de fluxo por meio do kit *Cytometric Bead Array* (CBA – BD®) e quantificadas por meio de curva padrão.

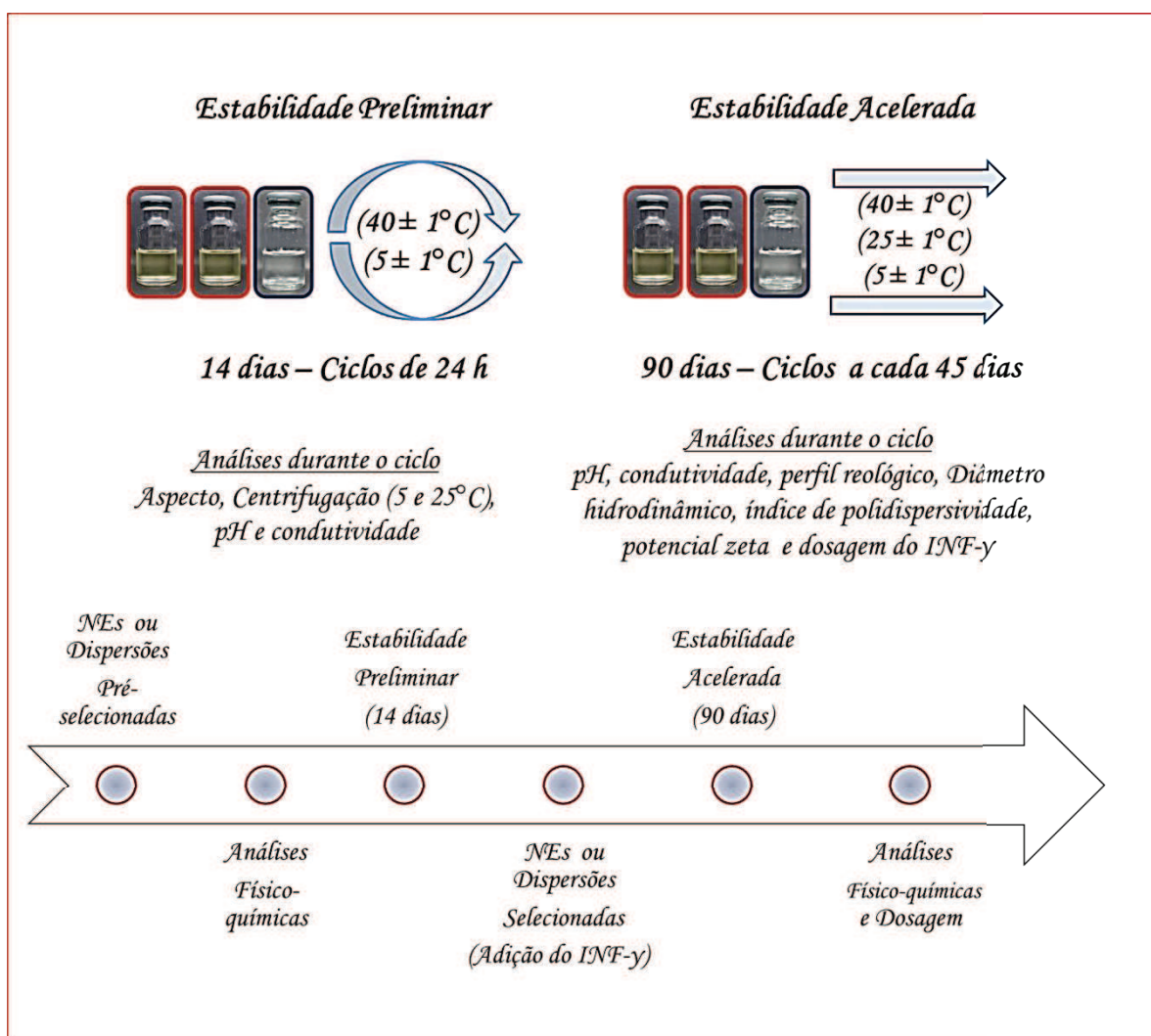


Figura 13. Ilustração das etapas e avaliações realizadas nos estudos de estabilidade utilizadas para o desenvolvimento das NEs e NPs.

CAPÍTULO 5

5 ENSAIOS BIOLÓGICOS

Neste capítulo são descritos os procedimentos experimentais relativos aos ensaios biológicos realizados visando aplicação imunológica.

5.1 Sujeitos e tamanho amostral

As amostras de sangue periférico foram coletadas por punção venosa de 15 indivíduos de ambos os sexos, na faixa etária compreendida entre 18 a 40 anos. Os participantes foram esclarecidos quanto à pesquisa, a finalidade do material biológico e o sigilo das informações, sendo que o material somente foi coletado sob expresso consentimento e assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (Apêndice).

5.2 Obtenção de fagócitos do sangue periférico

Foi coletado um volume de 8 a 15 mL de sangue periférico de cada doador em tubos de coleta contendo anticoagulante ácido etilenodiaminotetracético (EDTA a 25 U.mL⁻¹). Em seguida foi realizada a separação das populações celulares por meio de gradiente de densidade com a adição de Ficoll-Paque (Pharmacia[®]), onde o sangue foi centrifugado durante 40 min a 160 x *g* à temperatura ambiente. O anel enriquecido de fagócitos MN foi reservado. As células mononucleares foram lavadas duas vezes em PBS. A seguir foi realizada a contagem em câmara de Neubauer, e as concentrações celulares foram ajustadas para 2x10⁶ células.mL⁻¹ para análises posteriores.

5.3 Cultura de células

Células de câncer de mama humano (MCF-7) foram adquiridas de American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, VA, EUA). As monocamadas de células foram mantidas em culturas em frascos de 75 cm³ em meio RPMI-1640 (Roswell Park Memorial Institute) suplementado com 10% de soro bovino fetal (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, EUA), penicilina (20 U.mL⁻¹) e estreptomicina (20 ug.mL⁻¹) (Sigma-Aldrich Co.) a 37°C em atmosfera húmida contendo 5% CO₂. As células foram sub-cultivadas a cada 5 ± 2 dias.

5.4 Linhagem e Culturas de *Escherichia coli* Enteropatogênica

A *Escherichia coli* enteropatogênica (EPEC) sorotipo 0111:H⁻ AL⁻, eae⁺, eaf⁺, bfp⁺ foi utilizada nos experimentos realizados. A partir da cultura estoque, foram feitos repiques em tubos contendo 8 mL de TSB (Trypic Soy Broth - Difco), os quais foram incubados em estufa a 37°C durante 18 horas. Após o crescimento, as bactérias foram lavadas duas vezes em solução PBS e a concentração foi ajustada para 1x10⁷ bactérias.mL⁻¹, medida com espectrofotômetro (540 nm, DO= 0,1), conforme foi descrito previamente (HONORIO-FRANÇA et al., 1997).

5.5 Incubação dos fagócitos MN, das células MCF-7 e fagócitos MN/células MCF-7 com as nanoestruturas desenvolvidas

As células MCF-7 foram previamente incubadas, dependendo do ensaio específico, com as nanoestruturas desenvolvidas e seus respectivos controles em diferentes tempos. A concentração final de IFN- γ foi de 100 ng.mL⁻¹, de acordo

com protocolo previamente estabelecido (FAGUNDES et al., 2013; HONÓRIO-FRANÇA et al., 2016; MORAES et al., 2015). Todos os experimentos foram realizados com $n = 5$ amostras.

Para avaliação da viabilidade, os fagócitos MN foram incubados com as formulações 1NEPIFN- γ , 11NEBIFN- γ e F127-50IFN- γ durante períodos iguais a zero, 0,5 e 24 horas de em banho-maria a 37°C. Como controle dos experimentos, os fagócitos MN foram incubados em PBS pelo mesmo período.

Para avaliação da liberação de ânion superóxido, atividade fagocítica e bactericida, suspensões v/v de bactéria e fagócitos MN foram incubadas previamente com 50 μ L dos controles PBS, IFN- γ , 1NEP, 11NEB, F127-50 e com as formulações 1NEPIFN- γ , 11NEBIFN- γ e F127-50IFN- γ durante períodos iguais a zero, 0,5 h 1,0 h e 2 h, sob agitação a 37°C.

Para avaliação por citometria da viabilidade celular e da liberação intracelular de cálcio dos fagócitos MN, das células MCF-7 e fagócitos MN/células MCF-7, 500 μ L da suspensão de fagócitos MN, células MCF-7 e fagócitos MN com células MCF-7 v/v, foram tratados com 50 μ L dos controles PBS, IFN- γ , 1NEP, 11NEB, F127-50 e as formulações 1NEPIFN- γ , 11NEBIFN- γ e F127-50IFN- γ , e pré-incubados durante 24 horas a 37°C em atmosfera úmida contendo 5 % CO₂. Em seguida, as suspensões foram submetidas à tripsinação. Após este procedimento, as células foram centrifugadas duas vezes com PBS e avaliadas empregando-se protocolos específicos que serão descritos a seguir.

5.6 Viabilidade celular

A viabilidade dos fagócitos do sangue periférico humano foi avaliada por meio da técnica de alaranjado de acridina. O Alaranjado de acridina é um corante fluorocromo vital, metacromático, que se liga ao DNA ou RNA celular. Quando examinado sob um microscópio com luz ultravioleta, em contato com DNA de cadeia dupla, emite cor verde, ortocromática, e quando em contato com o DNA desnaturado ou despolarizado, ou RNA de cadeia simples, na forma metacromática, emite cor alaranjado ou avermelhado.

Decorrido o tempo de incubação as amostras foram centrifugadas (10 min a 160 x g). O sobrenadante foi desprezado e o botão celular “pellet” foi corado com 200 µl de alaranjado de acridina (concentração 14,4 mg.mL⁻¹). Posteriormente as amostras foram lavadas 3 vezes em PBS sob centrifugação (10 min a 160 x g). A seguir as lâminas foram preparadas e analisadas por meio de microscopia de fluorescência (Nikon® Eclipse E-200, Japan).

O índice de viabilidade celular foi obtido por meio da contagem de 100 células, contabilizando-se as células vivas, as que possuíam coloração verde, e as células mortas, com coloração alaranjada.

5.7 Liberação de ânion superóxido

A liberação de ânion superóxido pelos fagócitos MN do sangue periférico humano foi realizada visando estudar a ativação celular, empregando-se o cromógeno citocromo C (Sigma®, 2 mg.mL⁻¹). Na presença do ânion superóxido o ferricitocromo C sofre oxidação transformando-se em ferrocitocromo C.

A leitura foi feita no espectrofotômetro com leitor de microplacas (TP-Reader ThermoPlate[®]) com filtro de 630 nm. A concentração do ânion superóxido foi calculada por meio da seguinte relação: Concentração de O₂⁻ (nmol) = DO x 100 / 6,3.

5.8 Avaliação da fagocitose e da atividade bactericida

A atividade microbicida dos fagócitos MN do sangue periférico humano foi avaliada por meio da técnica de alaranjado de acridina (Acros organics[®]) (FRANÇA et al., 2011a). Após cada período de incubação a fagocitose foi interrompida por meio da adição de PBS e a suspensão foi centrifugada por 10 min a 160 x g sob refrigeração a 4°C. O "pellet" foi corado com 200 µL de laranja de acridina (concentração 14,4 mg.mL⁻¹) por 1 min e a seguir foi ressuspenso em meio 199, centrifugado e lavado com PBS. A seguir as lâminas foram montadas e as células contadas.

5.9 Teste de Permeabilidade celular ao Iodeto de propídeo

O teste de permeabilidade foi realizado utilizando-se o ensaio de fluorescência de Iodeto de Propídeo (PI) adaptado por (HONÓRIO-FRANÇA et al., 2016). Após incubação, as células foram coradas com 10 µL de PI (1 mg.mL⁻¹), Triton X-100 (5,5%), e ácido etilenodiaminotetracético (110 mM) e incubadas durante 10 minutos à temperatura ambiente. As células não coradas foram usadas como controle. A fluorescência das células foi analisada por citometria de fluxo. A percentagem de células viáveis foi inversamente proporcional à intensidade de fluorescência média geométrica de PI.

5.10 Liberação de cálcio intracelular

Para avaliar a liberação de Ca^{2+} intracelular foi utilizado o cromógeno Fluo3-acetoximetil (Sigma[®]). A suspensão de células foi centrifugada duas vezes (160 x g, 10 min. a 4°C) e ressuspendida em PBS contendo BSA (5mg.mL⁻¹). Após a incubação as células foram lavadas 2 vezes em PBS contendo BSA (5 mg.mL⁻¹; a 160 x g, por 10 min a 4°C).

A leitura foi realizada por citometria de Fluxo. O Fluo-3 foi detectado empregando-se o filtro 530/30 nm para Ca^{2+} intracelular. A proporção de liberação de Ca^{2+} foi expressa por meio dos valores médios (%) de intensidade de fluorescência de Fluo-3.

5.11 Aspectos legais

Este estudo como um todo, mas principalmente as avaliações biológicas, foram viabilizados por meio de uma parceria entre a Universidade de Brasília e a Universidade Federal de Mato Grosso por meio da associação das linhas de pesquisa em síntese e caracterização de complexos nanoestruturados e a de bioensaios e processos biológicos. O Projeto (Parecer favorável 1.018.274 / 2015) foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal do Mato Grosso. Os voluntários foram esclarecidos sobre os procedimentos da pesquisa e depois assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido, de acordo com os moldes da lei 466/12 que regulamenta a pesquisa em seres humanos.

5.12 Análises estatísticas

As análises estatísticas foram realizadas empregando-se o programa BioEstat 5.0. Diferenças estatísticas significantes nas curvas de fluxo, índice de viscosidade e parâmetros físico-químicos da estabilidade acelerada e para os ensaios biológicos, foram avaliados por meio de análise de variância (ANOVA) seguida de comparações múltiplas por meio do teste de Tukey. A significância estatística foi considerada para valores de p menores que 0,05.

CAPÍTULO 6

6 RESULTADOS: NANOEMULSÕES

Neste capítulo são apresentados os resultados da caracterização e otimização obtidos no desenvolvimento dos dois sistemas nanoemulsionados, à base de água destilada, triglicérides de ácido cáprico-caprílico, oletado de sorbitano, polisorbato 80 e como co-tensoativos o propilenoglicol (P) ou o 1-butanol (B). Inicialmente será descrito o roteiro empregado para a determinação da proporção mais adequada da fase tensoativa, seguido dos diagramas de fase pseudoternários e da caracterização reológica e por espalhamento dinâmico de luz das formulações pré-selecionadas contendo ou não IFN- γ .

6.1 Determinação da mistura de tensoativos

As concentrações dos co-tensoativos P e B para as a síntese de cada uma das nanoemulsões foram definidas como 10 % e as porcentagens dos tensoativos SP e TW foram calculadas de forma a atingir o EHL requerido pelo triglicerídeo de ácido cáprico/caprílico (Tabela 1). A fração da mistura de tensoativos/co-tensoativo na fração de 3,5:5,5:1,0 resultou no EHL requerido pela fase oleosa.

Tabela 1. Valores calculados de porcentagens e EHL obtidos para a mistura de tensoativos e co-tensoativos.

Mistura de Tensoativos	SP (%)	TW (%)	P (%)	B (%)	EHL _r
SP/TW/P	35	55	10	-	10,80
SP/TW/B	35	55	-	10	10,80

Onde: EHL_r = EHL Resultante da mistura de tensoativos.

6.2 Preparação dos sistemas nanoemulsionados

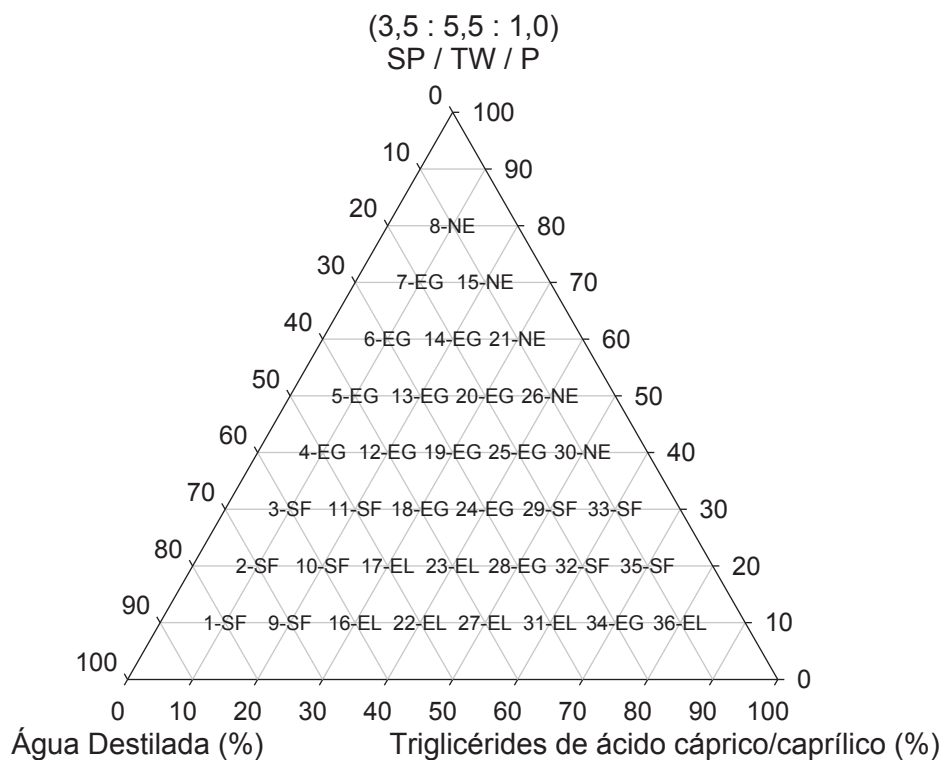
Os diagramas de fase pseudoternários para a classificação dos pontos e domínios de região para o sistema SP/TW/P e SP/TW/B estão apresentados nas Figura 14 e 15, respectivamente.

A mistura de tensoativos, independentemente do co-tensoativo, na proporção 3,5:5,5:1,0 associado ao triglicerídeo de ácido cáprico/caprílico e à água destilada em proporções pré-estabelecidas pelo diagrama, resultou em 36 pontos com características de equilíbrio divergentes. Observa-se nos diagramas correspondentes que proporções de tensoativo acima de 35 % para o sistema SP/TW/P e de 45 % para o SP/TW/B promoveram pontos com equilíbrio termodinâmico em virtude do predomínio de sistemas homogêneos e translúcidos (Figuras 14a e 15a, respectivamente).

As Figuras 14b e 15b apresentam as delimitações das regiões de domínios no diagrama pseudoternário a partir do diagrama de pontos e das titulações. Os pontos do sistema SP/TW/P (NEP) de 1 a 9NEP e de 1 a 13NEB do SP/TW/B (NEB) foram selecionados como domínios com características de NE para o estudo das regiões.

Analisando-se o comportamento das fases (Figuras 14b e 15b) observa-se que o sistema SP/TW/B resultou em uma região mais ampla de sistemas nanoemulsionados quando comparado ao sistema SP/TW/P. O co-tensoativo B promoveu a formação de NE até 20 % de fase aquosa, já o co-tensoativo P limitou a formação a 15 %. Contudo para ambos os sistemas, assim como nos diagramas de pontos, os domínios de região abaixo de 40 % de tensoativos indicaram instabilidade e separação de fases.

(a)



(b)

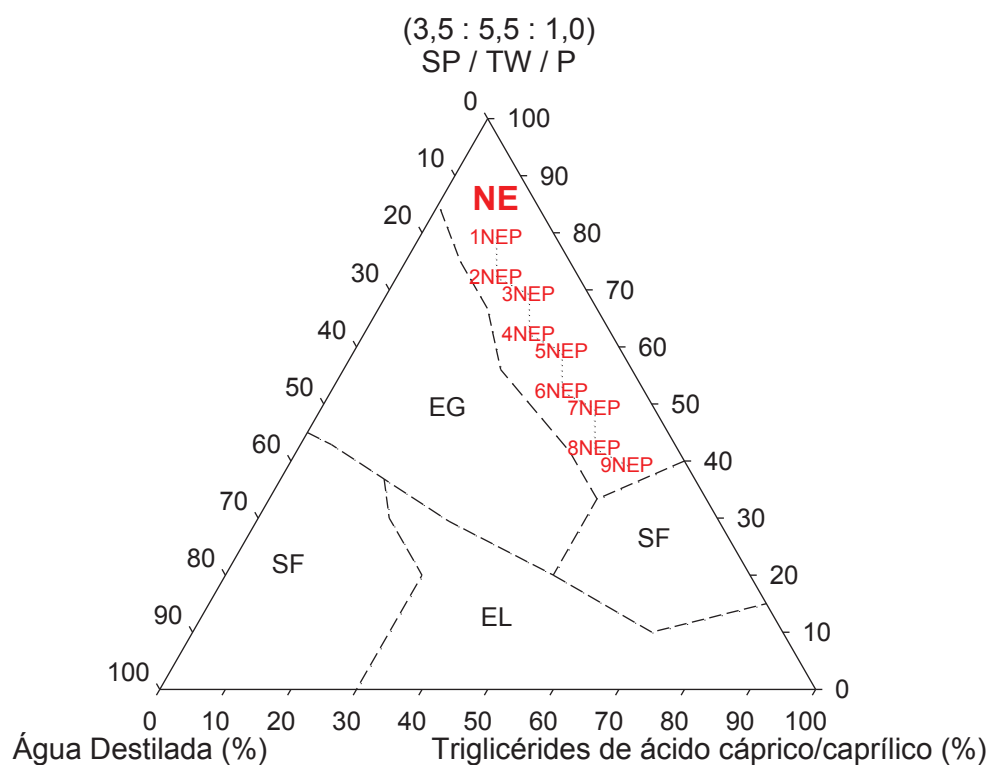
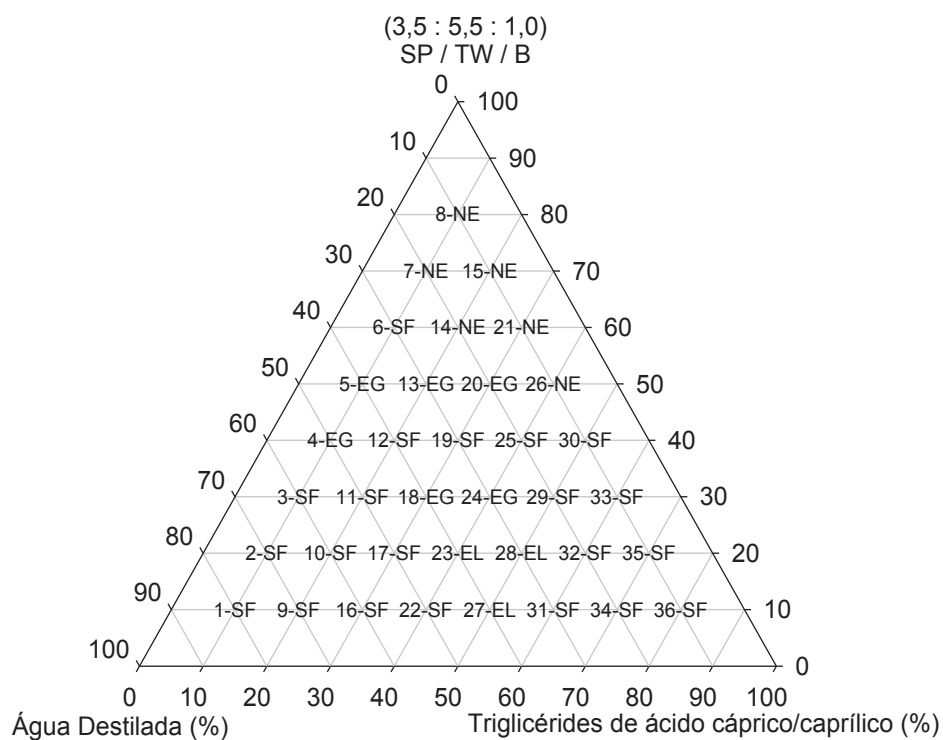


Figura 14. Diagramas pseudoternários de classificação dos pontos (a) e de domínios de região com as nanoemulsões selecionadas (b) do sistema SP/TW/P.
*Nanoemulsão (NE), Emulsão gel (EG), Emulsão Líquida (EL), Separação de Fases (SF).

(a)



(b)

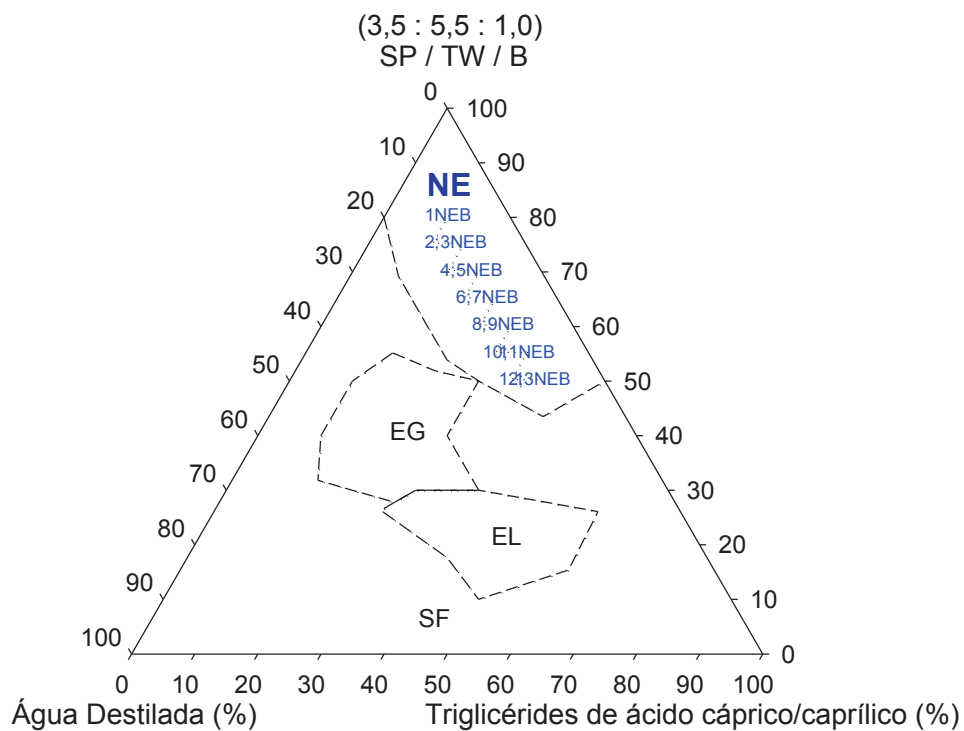


Figura 15. Diagramas pseudoternários de classificação dos pontos (a) e de domínios de região com as nanoemulsões selecionadas (b) do sistema SP/TW/B.
*Nanoemulsão (NE), Emulsão gel (EG), Emulsão líquida (EL), Separação de Fases (SF).

6.3 Caracterização reológica

6.3.1 Nanoemulsões do sistema SP/TW/P (NEP)

As Figuras 16 e 17 mostram as curvas de fluxo e de viscosidade dos pontos pré-selecionados para o estudo do sistema NEP. As áreas de histerese promovida pelos fluxos foram resumidas na Tabela 2 e as médias de viscosidade na Tabela 3.

As curvas de fluxo dos pontos relativos à região de nanoemulsão (NEP) apresentam início na origem e comportamento linear ascendente e descendente, exceto para os sistemas relativos às amostras 4, 6, 8 e 9NEP que apresentam fluxo não linear. A avaliação da curva e da área de histerese do fluxo indicou predomínio de fluidos Newtonianos (Figura 16 e Tabela 2). As nanoemulsões não-Newtonianas foram eliminadas do estudo (4,6,8 e 9NEP).

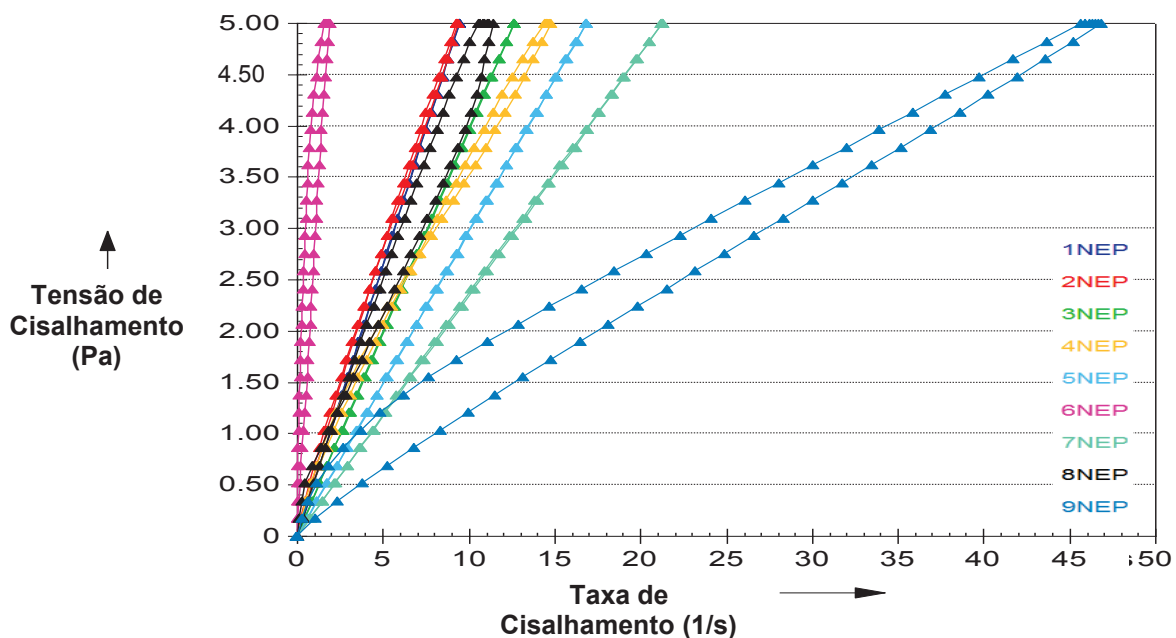


Figura 16. Curvas de fluxo obtidas das nanoemulsões pré-selecionados do sistema NEP (25°C).

Tabela 2. Valores de área de histerese e classificação do fluxo dos pontos pré-selecionados do sistema NEP, obtidos a partir dos dados da Figura 16.

NE	Área de Histerese (Pa/(s·ml))	Classificação do Fluxo
1NEP	+ 0,01	Newtoniano
2NEP	+ 0,60	Newtoniano
3NEP	+ 0,31	Newtoniano
4NEP	+ 1,18	Não-newtoniano: Tixotrópico Pseudoplástico
5NEP	+ 0,21	Newtoniano
6NEP	+ 1,57	Não-newtoniano: Tixotrópico Pseudoplástico
7NEP	+ 0,64	Newtoniano
8NEP	- 1,00	Não-newtoniano: Tixotrópico Reopéxico
9NEP	+ 22,62	Não-newtoniano: Tixotrópico Pseudoplástico

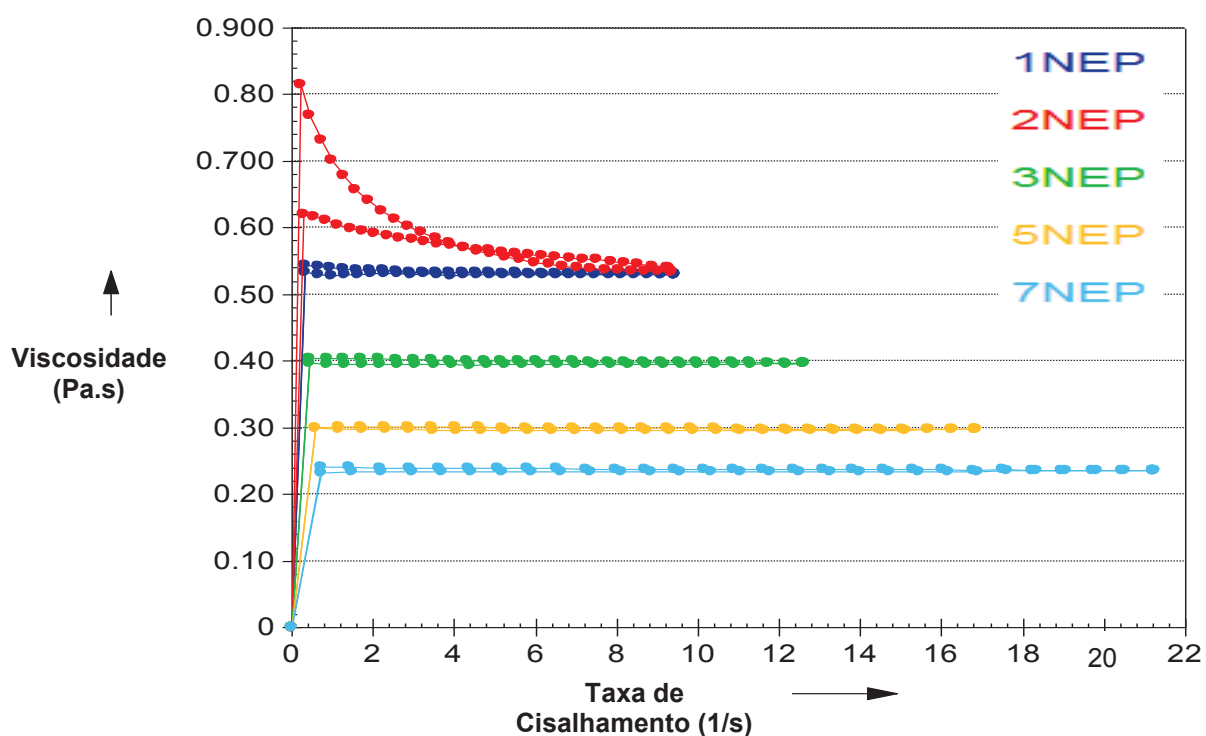


Figura 17. Curvas de viscosidade obtidas das nanoemulsões do sistema NEP (25°C).

Tabela 3. Valores de viscosidade e características do fluxo dos pontos do sistema NEP, obtidos da Figura 17.

NE	Viscosidade Média (Pa . s)	Característica
1NEP	0,5319 ± 0,0032	Linear
2NEP	0,5813 ± 0,0566	Não linear
3NEP	0,3975 ± 0,0029	Linear
5NEP	0,2979 ± 0,0016	Linear
7NEP	0,2358 ± 0,0019	Linear

Observa-se na Figura 17 e Tabela 3, que os valores da viscosidade são similares para os sistemas relativos aos pontos referentes à NEs Newtonianas, na faixa entre 0,20 e 0,60 Pa.s, e não se alteraram com o aumento da taxa de cisalhamento. No caso da nanoemulsão 2NEP, a viscosidade se reduz com o aumento da taxa de cisalhamento e, por isso foi descartada.

Os resultados das análises da variação da viscosidade dos pontos pré-selecionados para o estudo do sistema NEP em função da programação e controle de temperatura são mostrados na Figura 18. Observa-se que para as NEs 1, 3 e 5NEP ocorre uma redução gradual e homogênea da viscosidade, cujos valores variam pouco com a temperatura, o que é um indicativo de que apresentam boa estabilidade. A viscosidade do ponto 7NEP sofreu variações nas temperaturas de 5 a 25°C, sendo um indicativo de menor resistência a flutuações térmicas e foi descartada.

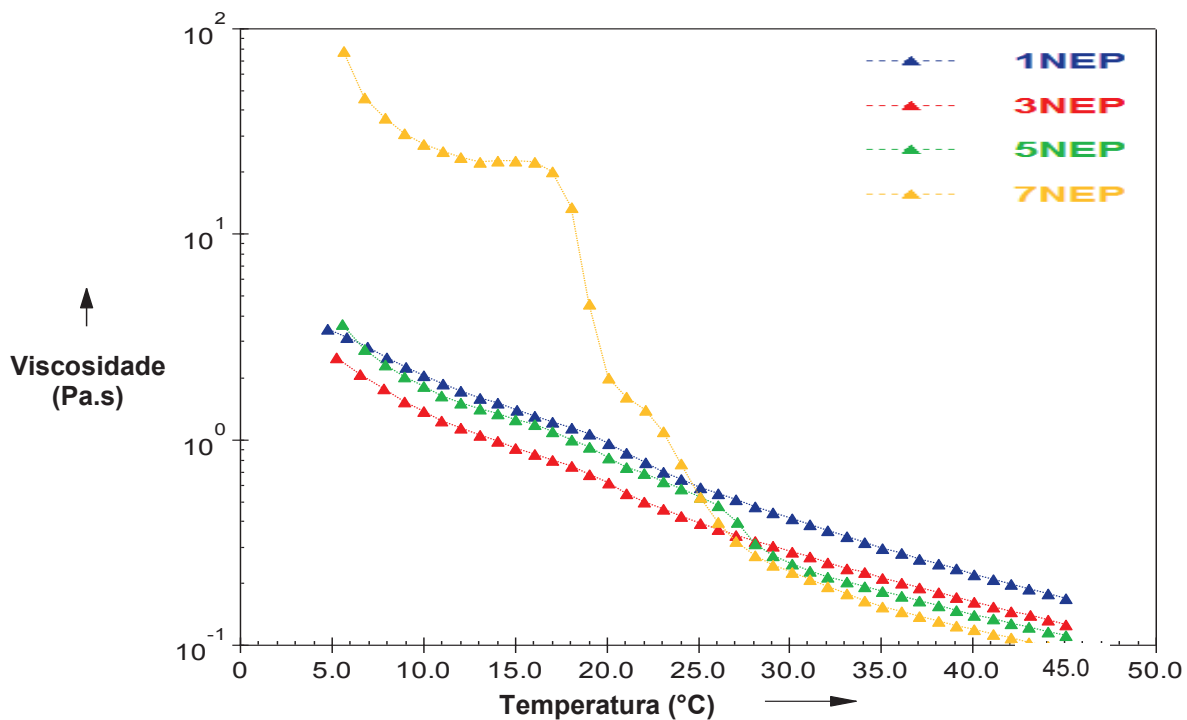


Figura 18. Curva de viscosidade de nanoemulsões do sistema NEP em função da temperatura (5 a 45°C).

As NEs com características de fluxo e viscosidade adequados do sistema NEP (1, 3 e 5NEP) foram formulados com a adição de nanodoses de interferon gamma (NEPIFN- γ) e foram reavaliados quanto à manutenção das características reológicas, cujos resultados são apresentados nas Figuras 19, 20 e 21 e Tabelas 4 e 5.

Observa-se na Figura 19 e na Tabela 4, que as curvas de fluxo das formulações (1, 3 e 5NEPIFN- γ) mantiveram as mesmas características das NEs correspondentes antes da incorporação do IFN- γ , apresentando início na origem e comportamento linear ascendente e descendente. A avaliação da curva e da área de histerese indicou comportamento de fluidos Newtonianos.

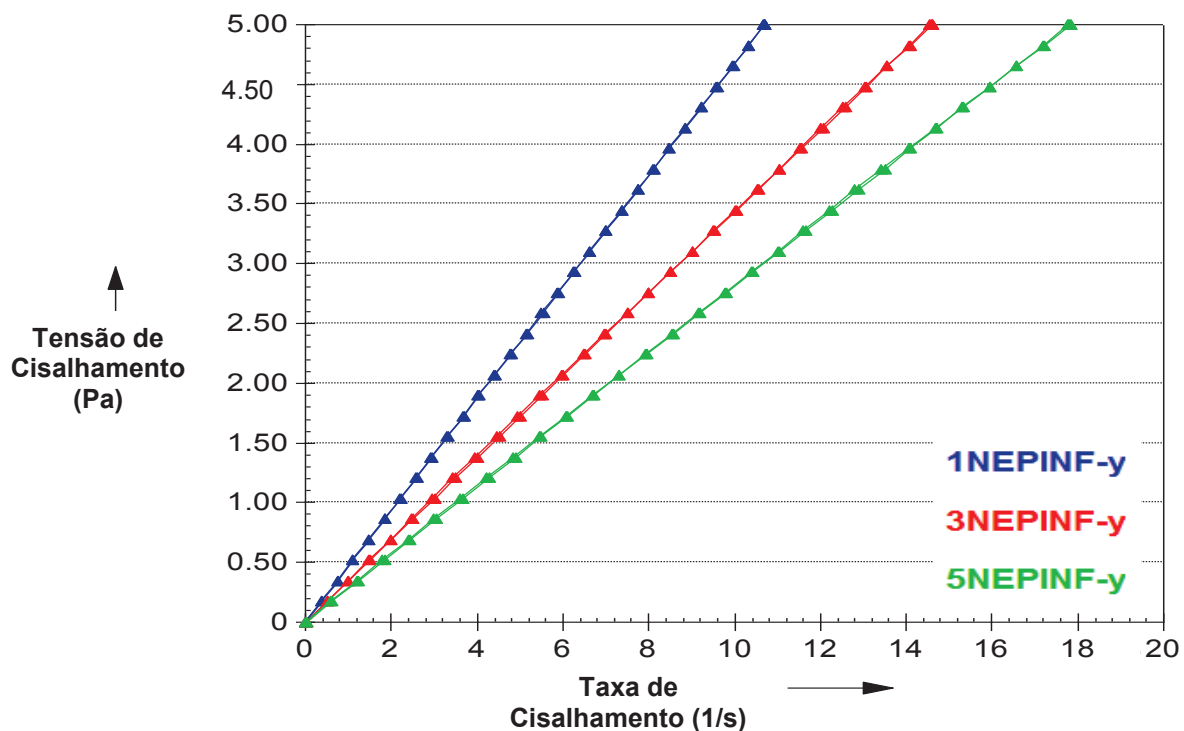


Figura 19. Curvas de fluxo das formulações (1, 3 e 5NEPIFN- γ) selecionadas do sistema NEP (25°C).

Tabela 4. Valores de área de histerese e classificação do fluxo das formulações (1, 3 e 5NEPIFN- γ) selecionadas do sistema NEP, obtidos a partir dos dados da Figura 19.

Formulação	Área de Histerese (Pa/(s·ml))	Classificação do Fluxo
1NEPIFN- γ	- 0,12	Newtoniano
3NEPIFN- γ	+ 0,76	Newtoniano
5NEPIFN- γ	- 0,22	Newtoniano

As curvas de viscosidade das formulações (Figura 20) apresentaram comportamento similar ao das NEs, com valores na faixa de 0,25 a 0,50 Pa.s (Tabela 5), que não se alteraram com o aumento da taxa de cisalhamento.

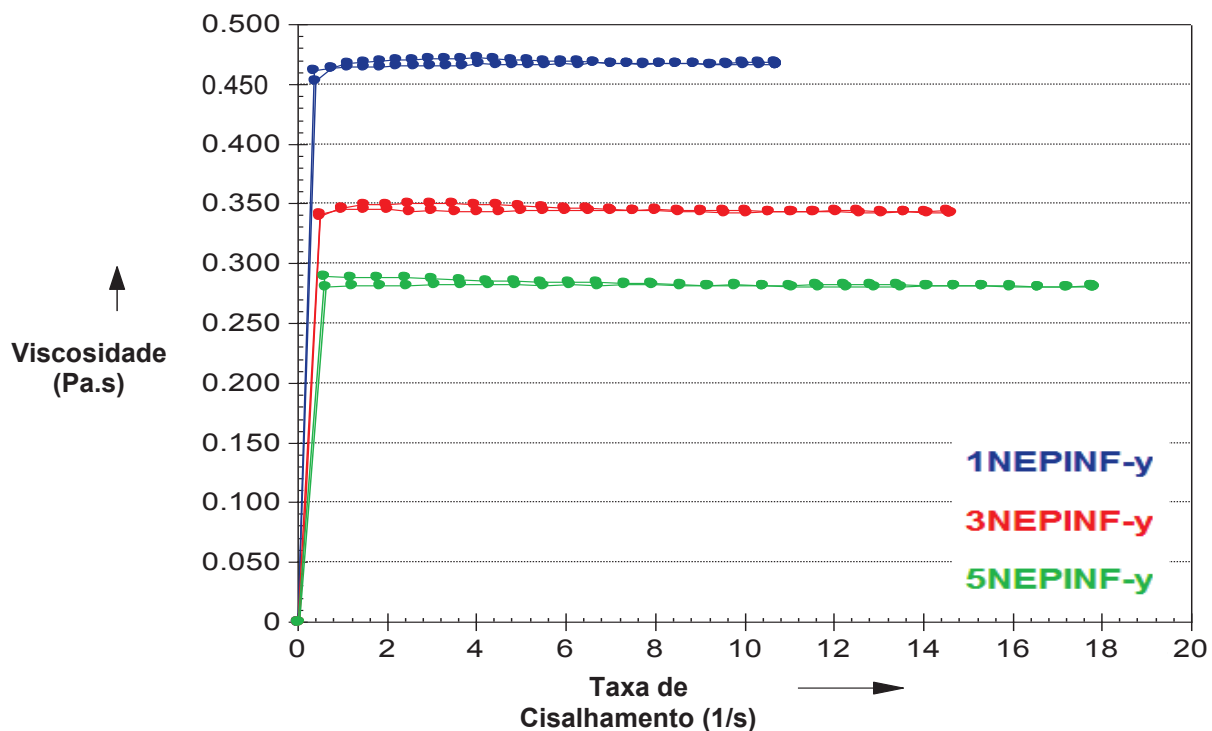


Figura 20. Curvas de viscosidade das formulações (1, 3 e 5NEPINF- γ) selecionadas do sistema NEP (25°C).

Tabela 5. Valores de viscosidade e características do fluxo das formulações (1, 3 e 5NEPINF- γ) selecionadas do sistema NEP, obtidos da Figura 20.

Formulação	Viscosidade Média (Pa . s)	Característica
1NEPINF- γ	0,4673 \pm 0,0029	Linear
3NEPINF- γ	0,3446 \pm 0,0023	Linear
5NEPINF- γ	0,2825 \pm 0,0022	Linear

As curvas de viscosidade em função da temperatura após a incorporação do IFN- γ (Figura 21) apresentaram mesmo comportamento das NEs (Figura 18), indicando que a estabilidade física foi mantida.

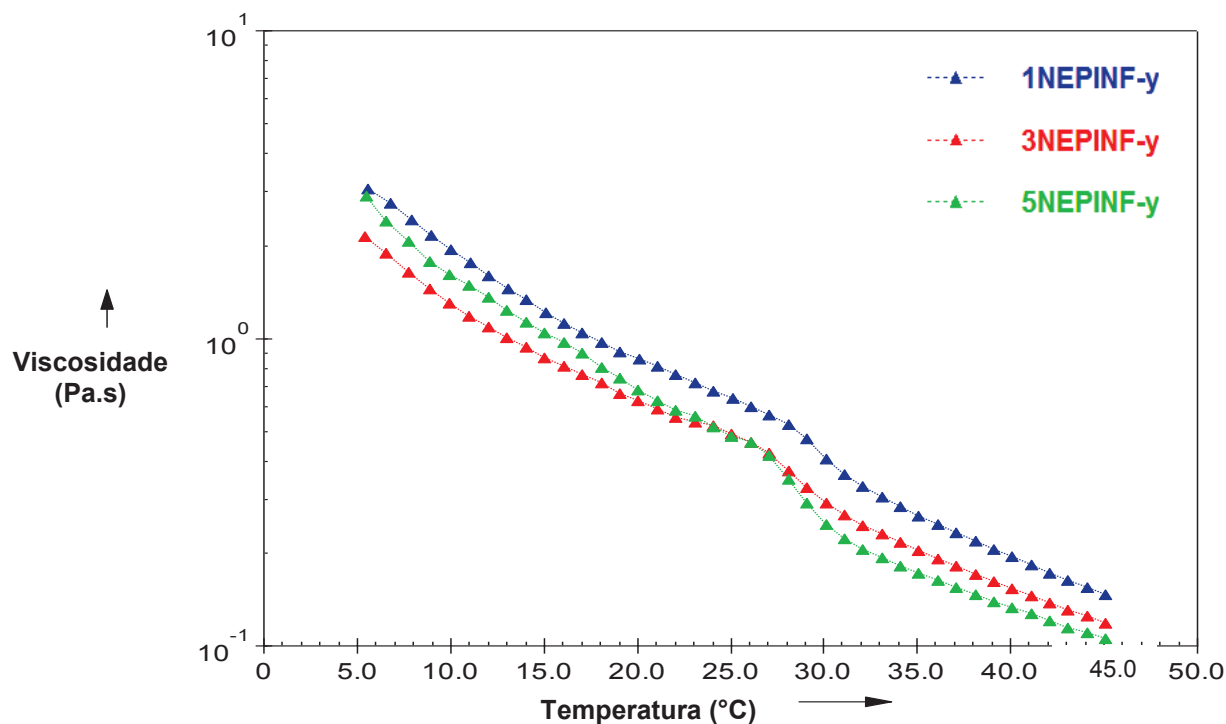


Figura 21. Curvas de viscosidade das formulações (1, 3 e 5NEPINF- γ) selecionadas do sistema NEP, em função da temperatura (5 a 45°C).

6.3.2 Nanoemulsões do sistema SP/TW/B (NEB)

As Figuras 22 e 23 apresentam as curvas de fluxo e de viscosidade das nanoemulsões pré-selecionadas (Figura 15) para o estudo do sistema NEB. As áreas de histerese listadas na Tabela 6 e as médias dos valores obtidos para a viscosidade na Tabela 7 foram obtidas a partir dos dados das Figuras 22 e 23, respectivamente.

Todas as curvas de fluxo das NEs do sistema NEB (Figura 22) apresentam início na origem e comportamento linear ascendente e descendente. A avaliação da área de histerese indicou características de fluxos Newtonianos (Tabela 6).

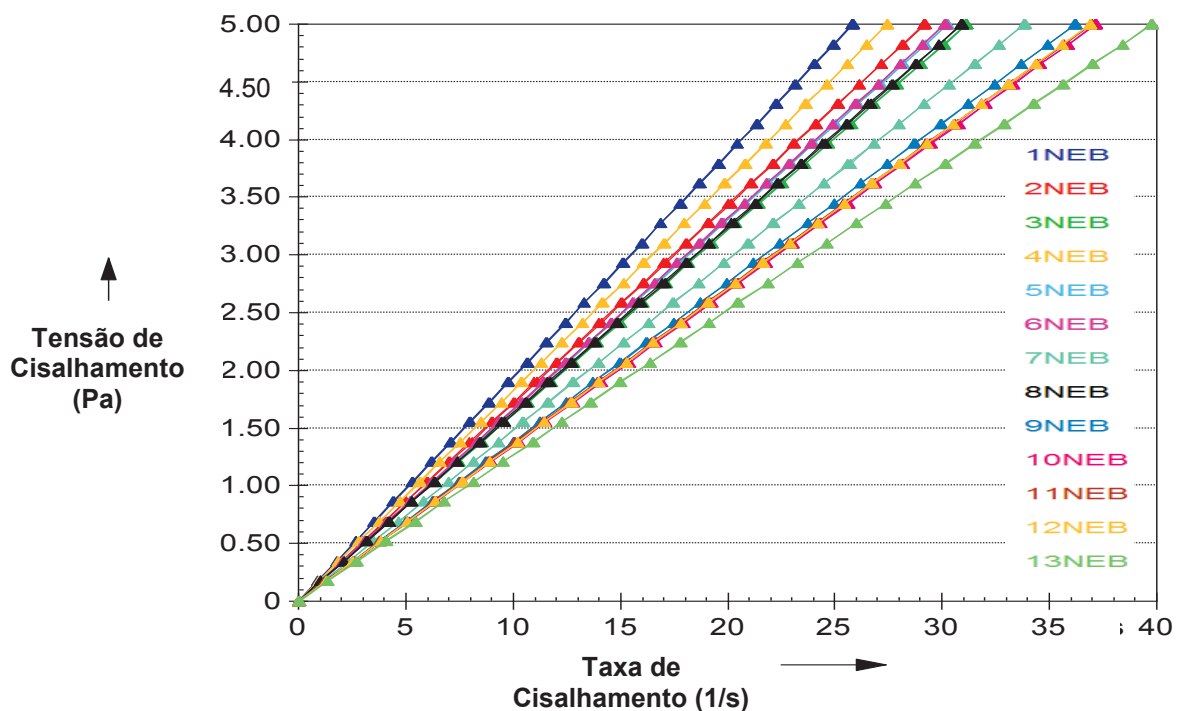


Figura 22. Curva de fluxo das nanoemulsões pré-selecionadas do sistema NEB (25°C).

Tabela 6. Valores de área de histerese e classificação do fluxo das nanoemulsões pré-selecionadas do sistema NEB, obtidos a partir dos dados da Figura 22.

NE	Área de Histerese (Pa/(s·ml))	Classificação do Fluxo
1NEB	- 0,01	Newtoniano
2NEB	- 0,32	Newtoniano
3NEB	- 0,15	Newtoniano
4NEB	- 0,04	Newtoniano
5NEB	- 0,08	Newtoniano
6NEB	- 0,14	Newtoniano
7NEB	+ 0,01	Newtoniano
8NEB	- 0,23	Newtoniano
9NEB	+ 0,01	Newtoniano
10NEB	- 0,17	Newtoniano
11NEB	- 0,04	Newtoniano
12NEB	- 0,08	Newtoniano
13NEB	- 0,03	Newtoniano

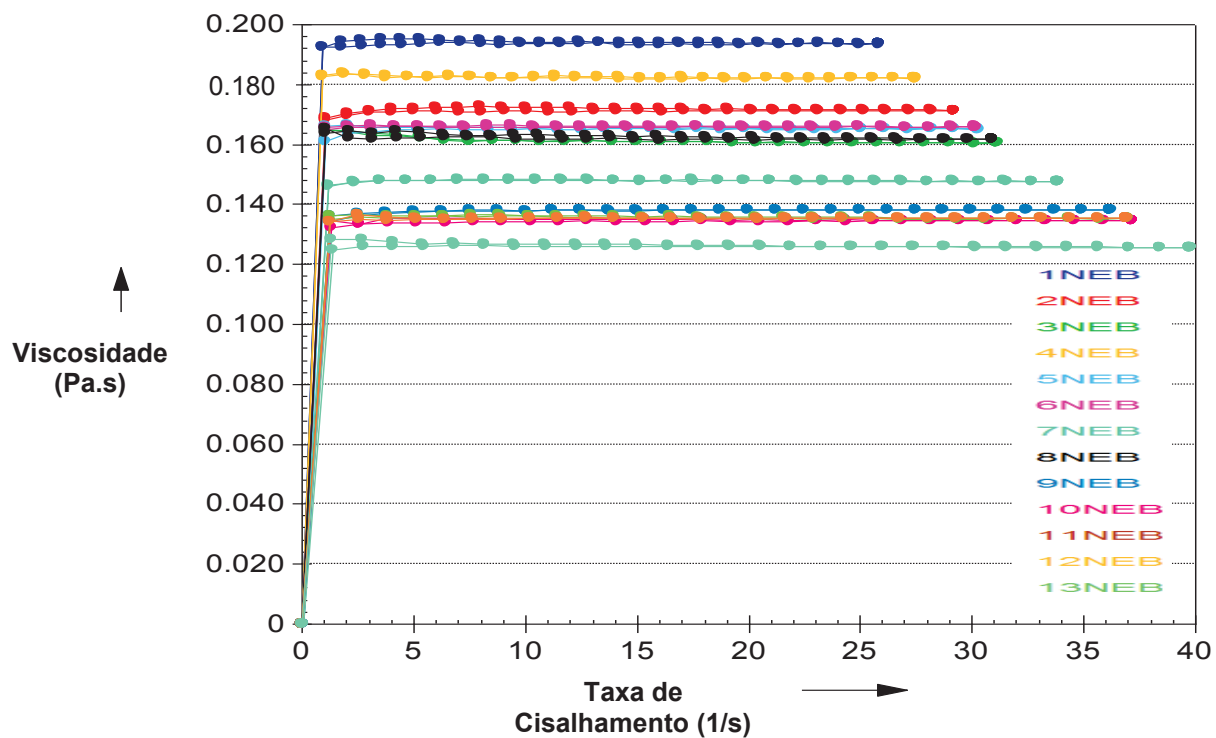


Figura 23. Curva de viscosidade das nanoemulsões pré-selecionadas do sistema NEB (25°C).

Tabela 7. Valores de viscosidade e características do fluxo das nanoemulsões do sistema NEB, obtidos a partir dos dados da Figura 23.

NE	Viscosidade Média (Pa . s)	Característica
1NEB	0,1938 ± 0,0007	Linear
2NEB	0,1714 ± 0,0008	Linear
3NEB	0,1614 ± 0,0011	Linear
4NEB	0,1823 ± 0,0005	Linear
5NEB	0,1651 ± 0,0027	Linear
6NEB	0,1660 ± 0,0002	Linear
7NEB	0,1479 ± 0,0004	Linear
8NEB	0,1625 ± 0,0008	Linear
9NEB	0,1378 ± 0,0006	Linear
10NEB	0,1347 ± 0,0006	Linear
11NEB	0,1356 ± 0,0006	Linear
12NEB	0,1352 ± 0,0005	Linear
13NEB	0,1262 ± 0,0006	Linear

As curvas de viscosidade para o sistema NEB mostrou comportamento similar ao das NEs, cujos valores de viscosidade foram obtidos na faixa entre 0,12 e 0,20 Pa.s, e permanecem praticamente constantes com o aumento da taxa de cisalhamento (Figura 23 e Tabela 7).

Os resultados das análises da variação da viscosidade dos pontos das nanoemulsões pré-selecionadas para o estudo do sistema NEB em função da temperatura estão registrados na Figura 24.

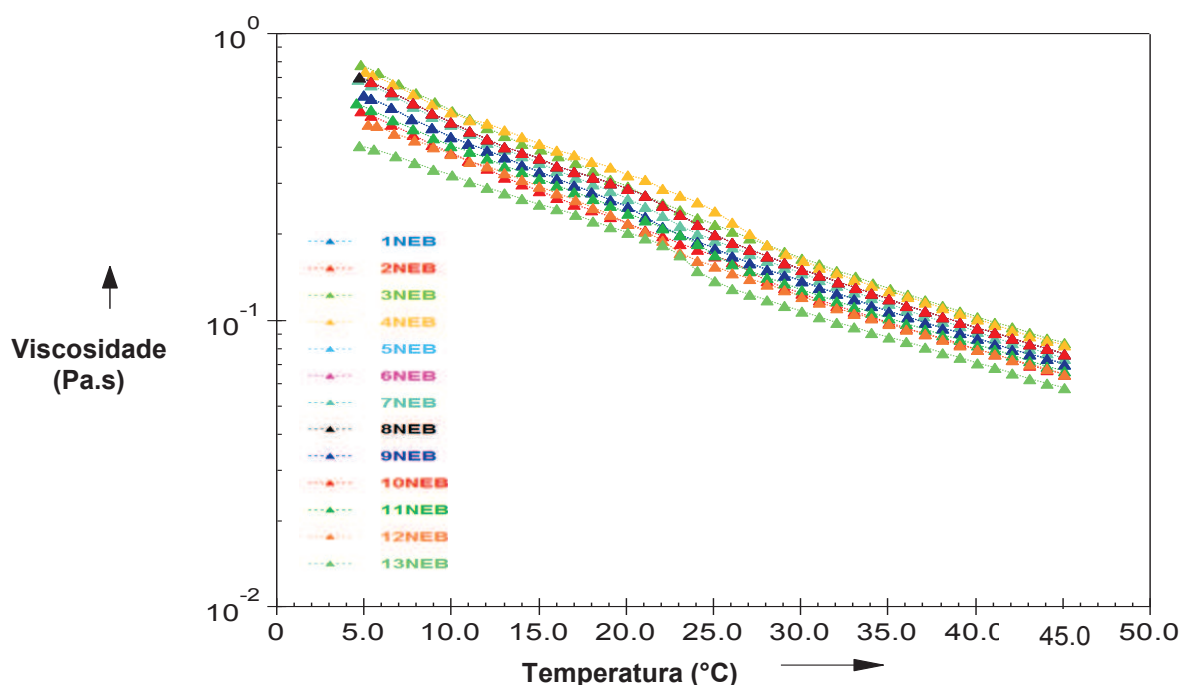


Figura 24. Curva de viscosidade das nanoemulsões pré-selecionadas do sistema NEB em função da temperatura (5 a 45°C).

Observa-se na Figura 24, que todas as amostras do sistema NEB apresentaram uma redução gradual e homogênea da viscosidade com a temperatura o que é um indicativo de boa estabilidade. As formulações 1, 2, 9, 12 e 13NEB apresentaram modificação de cor quando expostas à luz ambiente, o que não foi observado nas outras formulações, e por este motivo foram rejeitadas.

As NEs com características de fluxo e viscosidade adequados pré-selecionadas do sistema NEB foram formulados com a adição de nanodoses de interferon gamma (NEBIFN- γ) e foram re-avaliadas quanto às características reológicas, cujos resultados são apresentados nas Figuras 25, 26 e 27 e Tabelas 8 e 9.

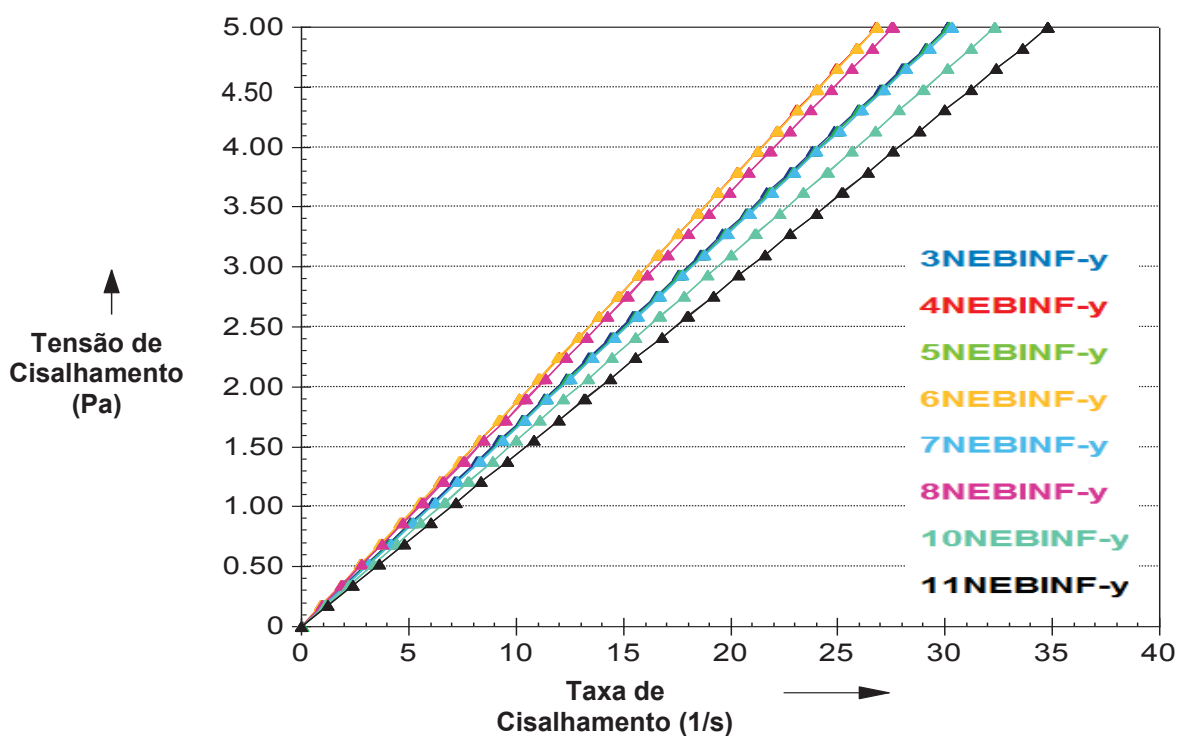


Figura 25. Curvas de fluxo das formulações (3, 4, 5, 6, 8, 8, 10 e 11NEBIFN- γ) do sistema NEB (25°C).

As curvas de fluxo das formulações (Figura 25) mantiveram as características das NEs correspondentes. A avaliação da curva e da área de histerese (Tabela 8) indica que o comportamento de fluidos Newtonianos foi mantido após a incorporação de IFN- γ .

Tabela 8. Valores área de histerese e classificação do fluxo das formulações (3, 4, 5, 6, 8, 8, 10 e 11NEBIFN- γ) do sistema NEB, obtidos a partir dos dados da Figura 25.

Formulação	Área de Histerese (Pa/(s·ml))	Classificação do Fluxo
3NEBIFN- γ	- 0,19	Newtoniano
4NEBIFN- γ	- 0,16	Newtoniano
5NEBIFN- γ	- 0,09	Newtoniano
6NEBIFN- γ	- 0,19	Newtoniano
7NEBIFN- γ	+ 0,03	Newtoniano
8NEBIFN- γ	+ 0,02	Newtoniano
10NEBIFN- γ	- 0,14	Newtoniano
11NEBIFN- γ	- 0,07	Newtoniano

A viscosidade das formulações foi similar à das NEs correspondentes, mas esteve entre 0,14 e 0,20 Pa.s, e não se alteraram com o aumento da taxa de cisalhamento (Figura 26 e Tabela 9).

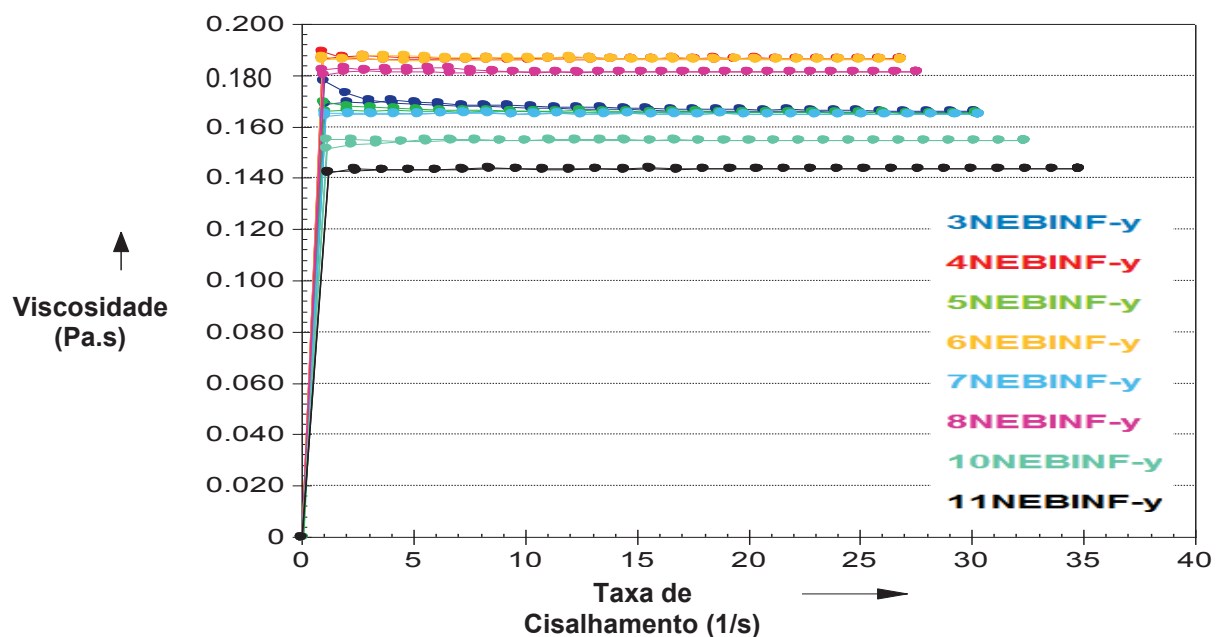


Figura 26. Curvas de viscosidade das formulações (3, 4, 5, 6, 8, 8, 10 e 11NEBIFN- γ) do sistema NEB (25°C).

Tabela 9. Valores de viscosidade e característica do fluxo das formulações (3, 4, 5, 6, 7, 8, 10 e 11NEBIFN- γ) do sistema NEB, obtidos a partir dos dados da Figura 26.

Formulação	Viscosidade Média (Pa . s)	Característica
3NEBIFN- γ	0,1674 \pm 0,0020	Linear
4NEBIFN- γ	0,1868 \pm 0,0007	Linear
5NEBIFN- γ	0,1661 \pm 0,0007	Linear
6NEBIFN- γ	0,1865 \pm 0,0006	Linear
7NEBIFN- γ	0,1650 \pm 0,0003	Linear
8NEBIFN- γ	0,1816 \pm 0,0007	Linear
10NEBIFN- γ	0,1549 \pm 0,0005	Linear
11NEBIFN- γ	0,1438 \pm 0,0005	Linear

O comportamento das curvas de viscosidade em função da temperatura (Figura 27) foi mantido, quando comparado com o das NEs correspondentes antes da incorporação do IFN- γ (Figura 24), indicando que a estabilidade foi mantida.

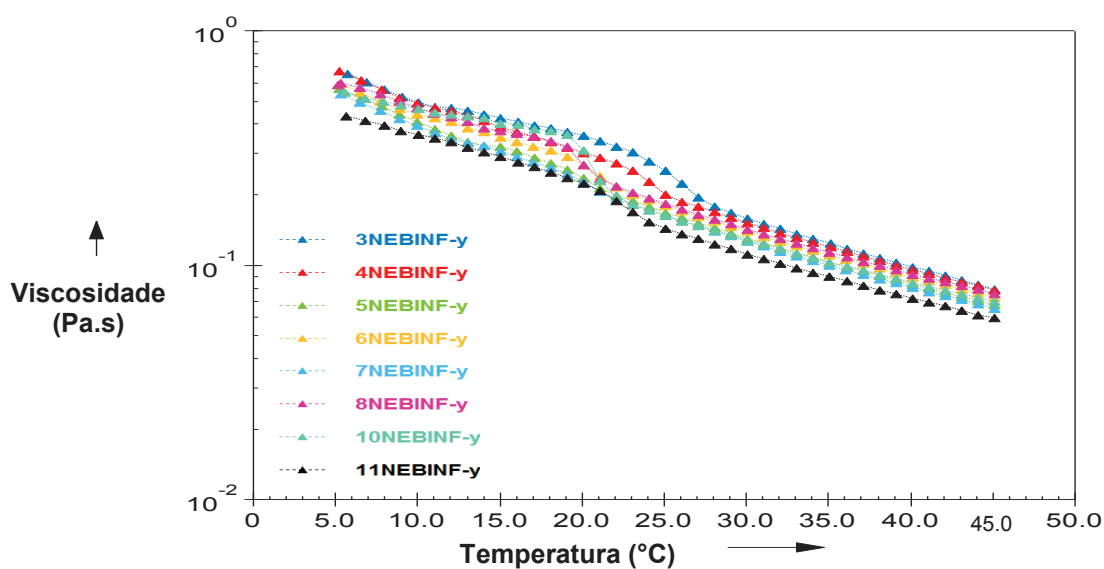


Figura 27. Curvas de viscosidade das formulações (3, 4, 5, 6, 8, 8, 10 e 11NEBIFN- γ) do sistema NEB em função da temperatura (5 a 45°C).

6.4 Caracterização por espalhamento dinâmico de luz

6.4.1 Nanoemulsões do sistema SP/TW/P (NEP)

A Tabela 10 apresenta os valores obtidos da medida de potencial zeta (ζ), do índice de polidispersividade (Pdi) e do diâmetro hidrodinâmico (D_H) das nanoemulsões pré-selecionadas e formulações correspondentes do sistema NEP.

Tabela 10. Valores de potencial zeta, índice de polidispersividade e diâmetro hidrodinâmico médios das formulações do sistema NEP, obtidos a partir dos dados da Figura 28.

NE ou Formulação	Ensaio		
	Potencial Zeta (mV)	Índice de polidispersividade	Diâmetro Hidrodinâmico (nm)
1NEP	-37,96	0.33	251,05
3NEP	- 41,27	0.31	316,83
5NEP	-32,30	0.16	429,03
1NEPIFN-γ	-34,43	0,41	204,95
3NEPIFN-γ	-38,00	0,37	183,07
5NEPIFN-γ	0,00	0,19	1074,45

O potencial ζ do sistema NEP contendo ou não IFN- γ apresenta valores negativos e em torno de -40 mV, exceto para a formulação 5NEP que apresentou valor nulo após a incorporação da citocina, indicando desestabilização iônica ou inversão de fase para A/O. A polidispersividade do sistema NEP esteve entre 0,16 e 0,41 (Tabela 10).

Os valores obtidos para o tamanho hidrodinâmico (D_H) das gotículas dos colóides do sistema NEP apresentaram tendência de redução após o processo de incorporação do IFN- γ , com valores de 205 e 183 nm para as amostras 1NEPIFN-

γ e 3NEPIFN- γ , respectivamente. Enquanto a formulação 5NEP- γ teve o valor do D_H muito aumentado e foi descartada (Figura 28 e Tabela 10).

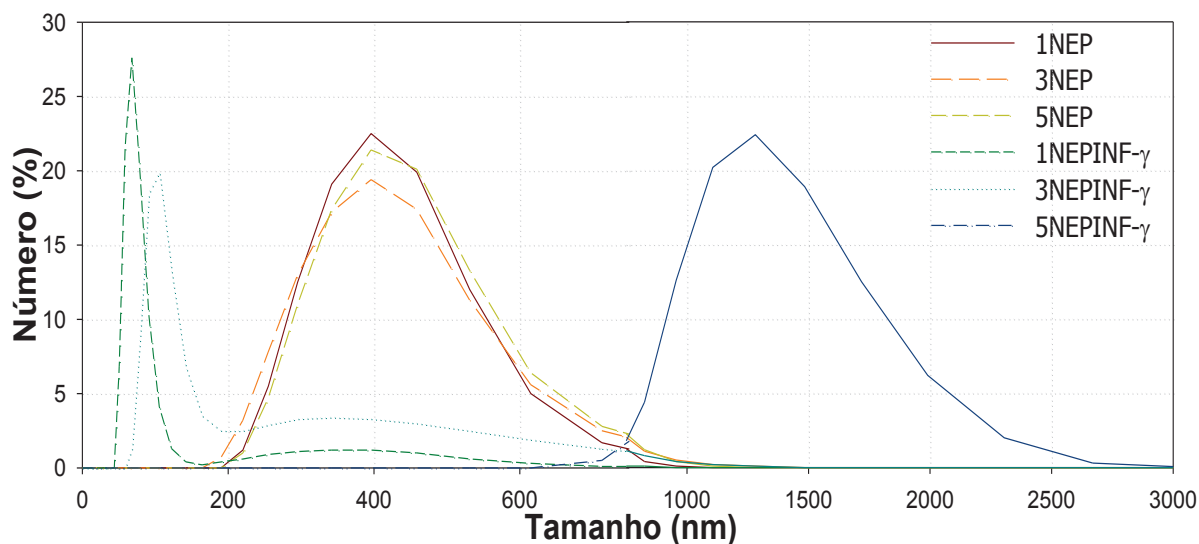


Figura 28. Distribuição de tamanho de gotículas das nanoemulsões (1,3, e 5NEP) e formulações (1,3,5NEP IFN- γ) do sistema NEP.

6.4.2 Nanoemulsões do sistema SP/TW/B (NEB)

A Tabela 11 apresenta os valores de potencial zeta, índice de Pdi e D_H médios das formulações do sistema NEB, antes e após a incorporação de IFN- γ , obtidos a partir dos dados da Figura 29.

O valor médio do tamanho hidrodinâmico das gotículas para a maioria das formulações do sistema NEB apresentou tendência de aumento após a incorporação do IFN- γ , sendo que as formulações 10NEBIFN- γ e 11NEBIFN- γ apresentaram D_H de 97e 76 nm, respectivamente. As formulações 3, 4, 5, 6, 7 e 8NEBIFN- γ mantiveram D_H entre 170 e 200 nm e em virtude do maior diâmetro

hidrodinâmico e Pdi, quando comparados com as selecionadas, optou-se por excluí-las do grupo.

Tabela 11. Valores de potencial zeta, índice de polidispersividade e diâmetro hidrodinâmico médios das nanoemulsões (3,4,5,6,7,8,10 e 11NEB) formulações (3 a 11NEBIFN- γ) do sistema NEB, obtidos dos dados da Figura 29.

NE ou Formulação	Ensaio		
	Potencial Zeta (mV)	Índice de polidispersividade	Diâmetro Hidrodinâmico (nm)
3NEB	-37,70	0.31	291,10
4NEB	- 39,90	0.39	186,83
5NEB	-34,10	0.46	147,90
6NEB	- 31,50	0.41	132,05
7NEB	-31,70	0.42	108,60
8NEB	- 29,00	0.44	65,05
10NEB	-32,30	0.26	44,32
11NEB	- 28,30	0.16	73,79
3NEBIFN-γ	-38,40	0.42	173,41
4NEBIFN-γ	-38,10	0,35	185,19
5NEBIFN-γ	-36,90	0,35	199,50
6NEBIFN-γ	-36,00	0,33	175,93
7NEBIFN-γ	-37,10	0,37	139,80
8NEBIFN-γ	-35,30	0,31	241,47
10NEBIFN-γ	-33,70	0,24	97,42
11NEBIFN-γ	-30,30	0,23	75,55

Em geral, das formulações selecionadas, as NEPIFN- γ apresentaram valores de potencial ζ e Pdi superior aos apresentados pelas formulações NEBIFN- γ , já D_H inferiores a 100 nm foram observados apenas para as formulações contendo 1-butanol como co-tensoativo.

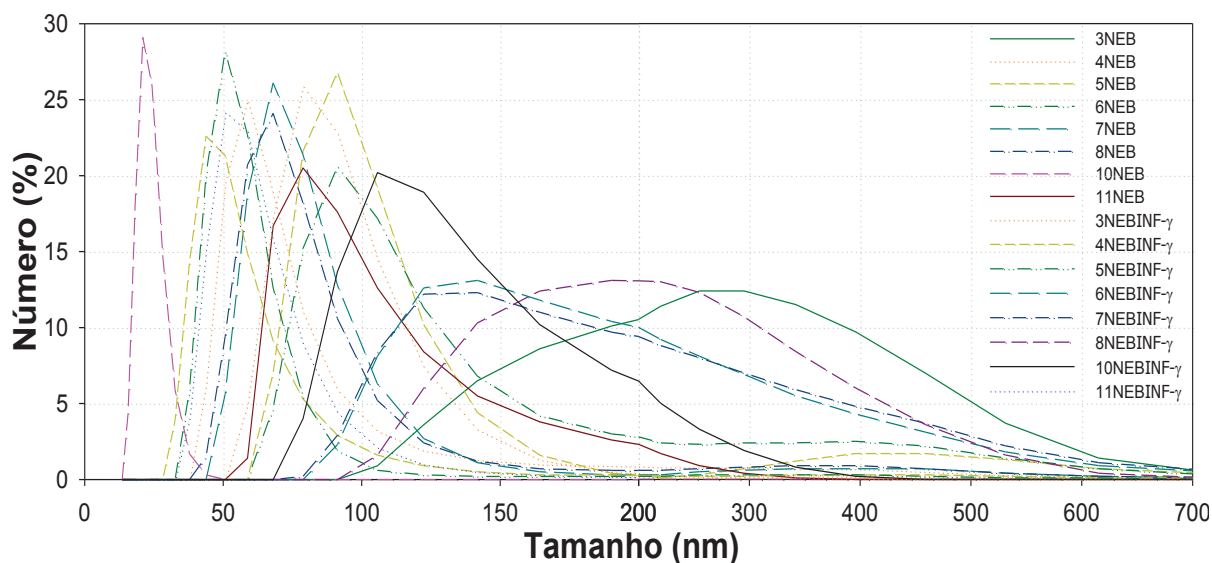


Figura 29. Distribuição de tamanho de gotículas das formulações do sistema NEB.

Quando se comparou as NEs ($n = 3$) e suas respectivas formulações no mesmo sistema (1NEPIFN- γ e 3NEPIFN- γ ou 10NEBIFN- γ e 11NEBIFN- γ) a veiculação do IFN- γ não alterou estatisticamente o D_H ($p = 0,5483$ e $0,6012$, respectivamente). Ao comparar estes mesmos grupos o potencial ζ também não foi significativamente modificado ($p = 0,2100$ e $0,6012$, respectivamente).

Portanto, a fração da mistura de tensoativos/co-tensoativo de 3,5:5,5:1,0 resultou no EHL requerido pela fase oleosa, mas observa-se que o sistema SP/TW/B promoveu uma região mais ampla de sistemas nanoemulsionados quando comparado ao sistema SP/TW/P. Os pontos de 1 a 9NEP do sistema SP/TW/P e de 1 a 13NEB do SP/TW/B foram selecionados para o estudo das regiões. Os estudos reológicos indicaram que as NE desenvolvidas apresentam predominantemente perfil Newtoniano e viscosidade linear. A avaliação das curvas, da área de histerese e resistência da viscosidade em função de variações

de temperatura indicaram estabilidade física para as formulações 1, 3 e 5NEPIFN- γ e 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 e 11NEBIFN- γ . Posteriormente, quando avaliadas por meio da técnica de espalhamento de luz dinâmico os dados indicaram que a formulação 5NEPIFN- γ apresenta potencial ζ nulo e D_H elevado quando comprado a 5NEP, indicando perda de estabilidade. Apesar das formulações 3, 4, 5, 6, 7, 8 e 9NEBIFN- γ não sofrerem modificações abruptas com a incorporação do IFN- γ , os valores de D_H e Pdi mais elevados podem indicar possibilidade de uma desestabilização posterior. Por estes indícios e para otimização do número de formulações a serem avaliadas estas amostras foram excluídas. A partir desta triagem, as formulações 1NEPIFN- γ , 3NEPIFN- γ , 10NEBIFN- γ e 11NEBIFN- γ foram selecionadas para estudos posteriores de avaliação de estabilidade.

CAPÍTULO 7

7. RESULTADOS: MICELAS DE PLURONIC 127

Neste capítulo são apresentados os resultados obtidos para o desenvolvimento das micelas nanoestruturadas de pluronic F127. Inicialmente serão relatados os dados da caracterização reológica e, em seguida os das análises de espalhamento dinâmico de luz das nanoemulsões e das formulações contendo IFN- γ .

7.1 Caracterização reológica

As Figuras 30 e 31 apresentam as curvas de fluxo e de viscosidade das dispersões em concentrações pré-selecionados para o estudo do sistema F127. Os valores das áreas de histerese e de viscosidade foram listados nas Tabelas 12 e 13, respectivamente, a partir dos dados obtidos das Figuras 30 e 31.

As curvas de fluxo das dispersões apresentam início na origem e comportamento não linear ascendente e descendente, sendo classificados como não-Newtonianos (Figura 30). A dispersão de F127 em 250 mg.mL^{-1} (F127-250) não apresentou capacidade de fluxo a $25 \text{ }^\circ\text{C}$. Em adição, o perfil das curvas apresentadas na Figura 30 indica que com início do cisalhamento a dispersão que flui não apresenta limite de escoamento, mas pode-se observar uma área de histerese expressiva (Tabela 12), com curva descendente inferior à ascendente. Este tipo de perfil descreve fluidos do tipo pseudoplásticos com tixotropia.

Observa-se na Figura 31 que o comportamento das curvas de viscosidade das dispersões do sistema F127 é similar, mas depende da taxa de cisalhamento, apresentando perfil não linear, enquanto os valores obtidos para a viscosidade listados na Tabela 13 estão entre 0,002 e 0,003 Pa.s.

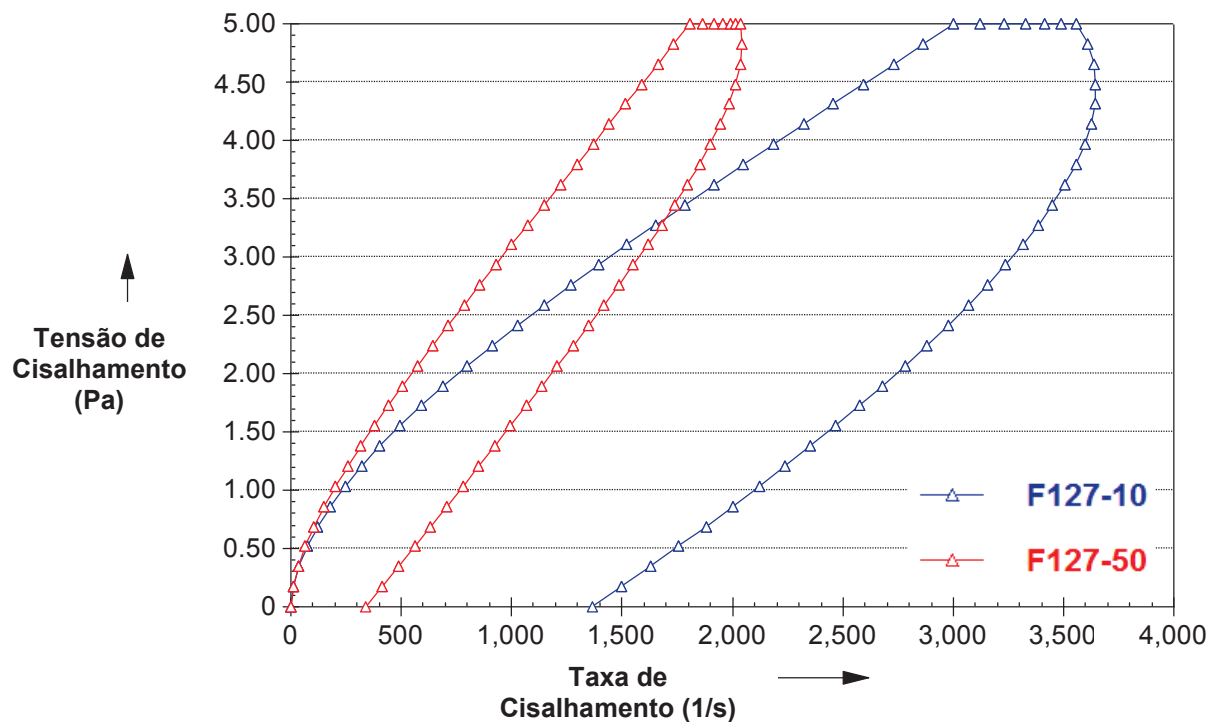


Figura 30. Curvas de fluxo das dispersões pré-selecionadas (127-10 e F127-50) (25°C).

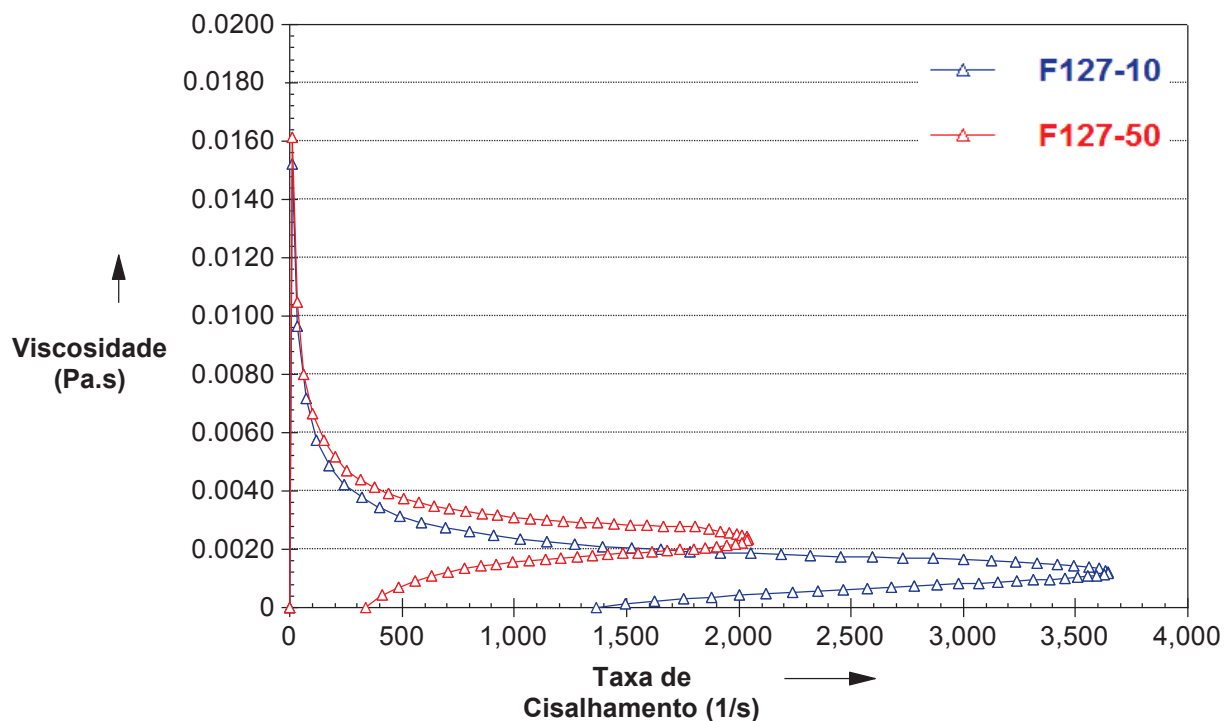


Figura 31. Curvas de viscosidade das dispersões pré-selecionadas (127-10 e F127-50) (25°C).

Os resultados das análises da variação da viscosidade das dispersões do sistema F127 em função da temperatura são apresentados na Figura 32.

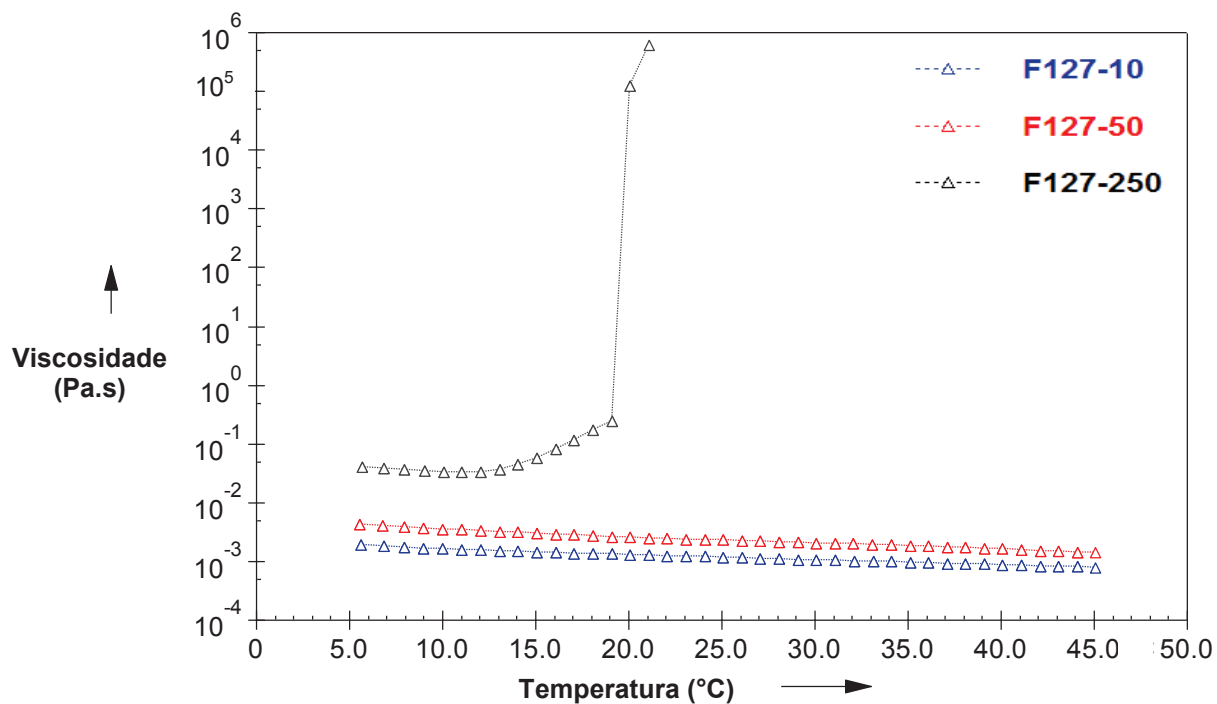


Figura 32. Curvas de viscosidade das dispersões pré-selecionadas 127-10, F127-50 e F127-250 em função da temperatura (5 a 45°C).

As curvas de viscosidade das dispersões F127-10 e F127-50 permanecem praticamente constantes com a temperatura. No caso da amostra F127-250 o valor da viscosidade aumentou gradativamente até níveis extremos a partir de 19°C, sendo um indicativo de alteração do estado físico (Figura 32).

As dispersões com características de fluxo e viscosidade mais adequados do sistema F127 (F127-10 e F127-50) foram formuladas com a adição do interferon gamma (F127IFN- γ) e foram reavaliadas quanto às características reológicas, cujos resultados são apresentados nas Figuras 33, 34 e 35, a partir dos quais foram obtidos os valores listados nas Tabelas 12 e 13.

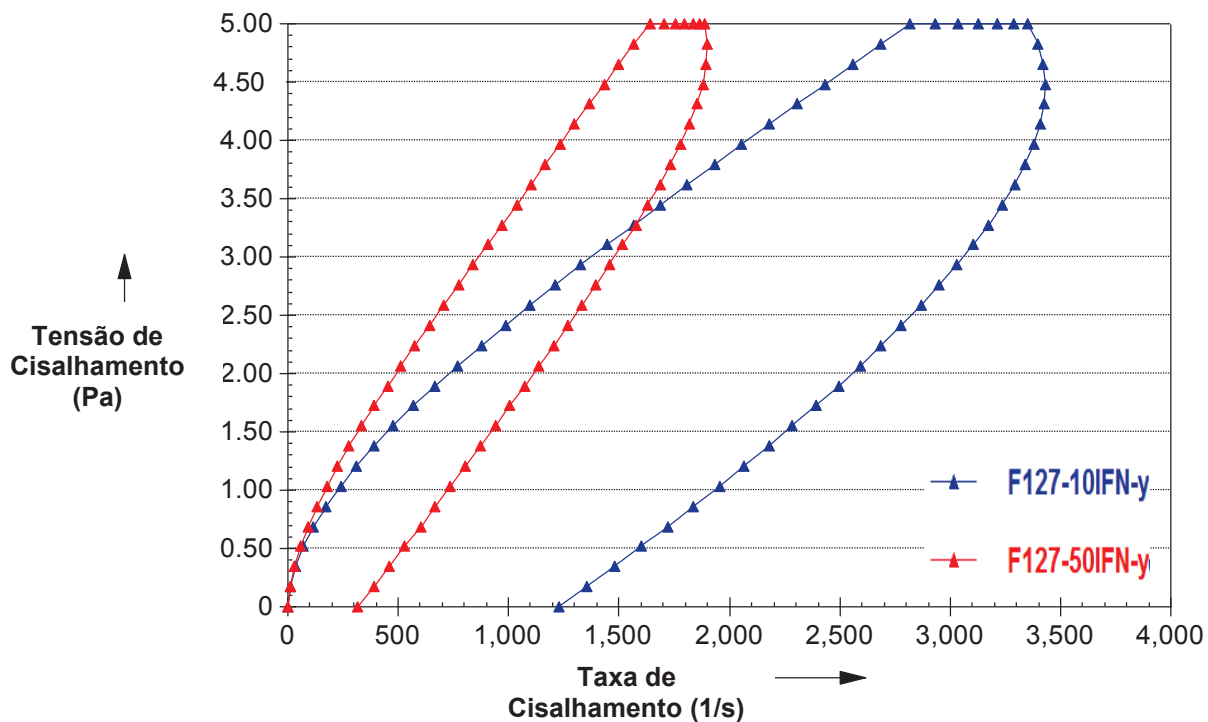


Figura 33. Curva de fluxo das formulações 127-10IFN- γ e F127-50IFN- γ (25°C).

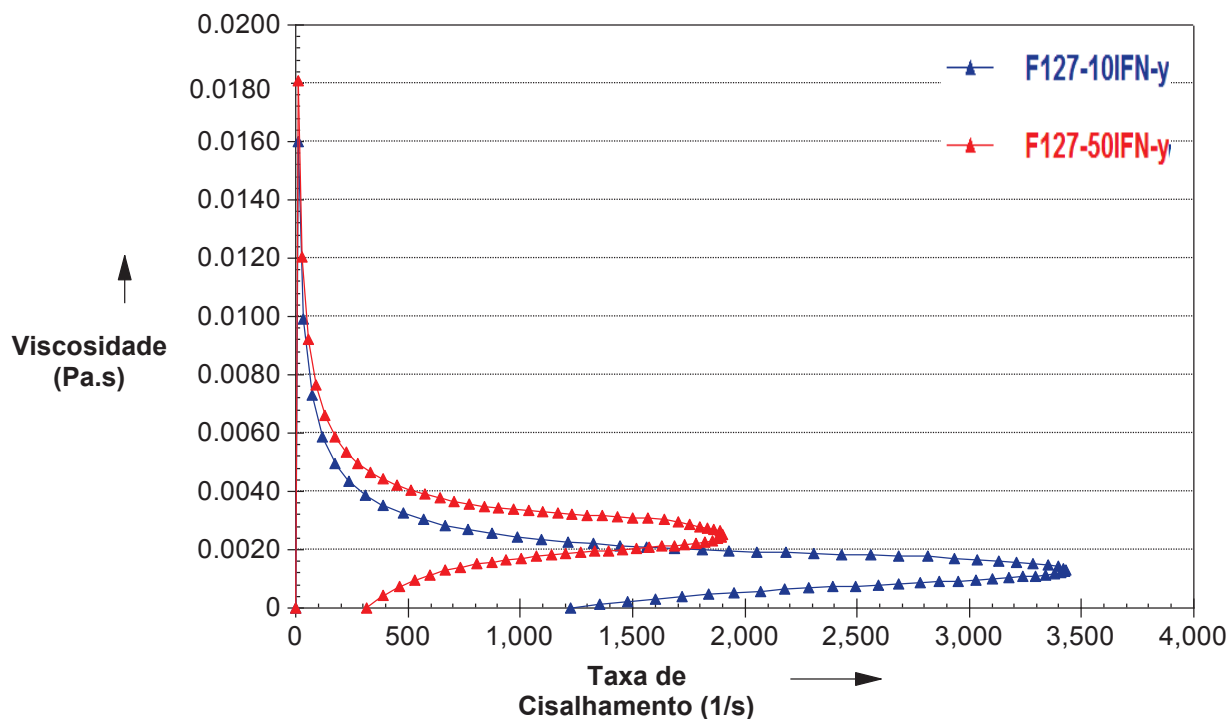


Figura 34. Curvas de viscosidade das formulações 127-10IFN- γ e F127-50IFN- γ (25°C).

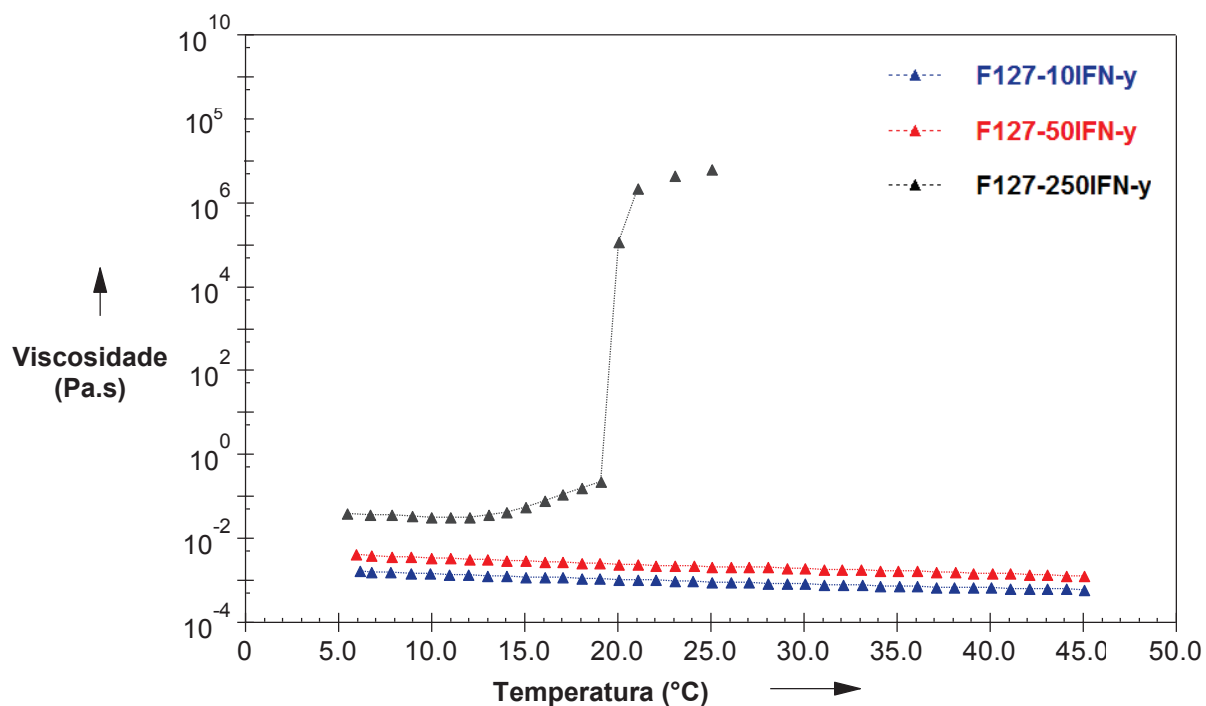


Figura 35. Curvas de viscosidade das formulações 127-10IFN- γ , F127-50IFN- γ e F127-250IFN- γ em função da temperatura (5 a 45°C).

Comparando-se as curvas de fluxo das formulações (Figura 33) com as das dispersões (Figura 30) observa-se comportamento similar. Apresentam início na origem e comportamento não linear ascendente e descendente, correspondendo às características de fluidos Não-newtonianos, pseudoplásticos com tixotropia (Figura 33 e Tabela 12).

O comportamento das curvas de viscosidade das formulações (Figura 34) foi similar ao das dispersões (Figura 31), obtendo-se valores de viscosidade entre 0,002 e 0,003 Pa.s, os quais também variam com o aumento da taxa de cisalhamento, apresentando perfil não linear (Figura 34 e Tabela 13).

Observa-se na Figura 35 que as curvas de viscosidade em função da temperatura para as formulações F127-10IFN- γ e F127-50IFN- γ variam pouco em função da temperatura, comportamento similar ao das dispersões sem IFN- γ .

No caso da amostra F127-250IFN- γ , o valor da viscosidade foi aumentando gradativamente até níveis extremos a partir de 19°C, sendo um indicativo de alteração do estado físico (Figura 35), mesmo comportamento da dispersão correspondente.

Tabela 12. Valores da área de histerese e classificação do fluxo das dispersões pré-selecionadas 127-10 e F127-50 e das formulações 127-10IFN- γ e F127-50IFN- γ obtidos a partir dos dados das Figuras 30 e 33.

Dispersão ou formulação	Área de Histerese (Pa/(s·ml))	Classificação do Fluxo
F127-10	+ 10.010,19	Não-newtoniano: Tixotrópico Pseudoplástico
F127-50	+ 3.105,70	Não-newtoniano: Tixotrópico Pseudoplástico
F127-10IFN- γ	+ 9.107,07	Não-newtoniano: Tixotrópico Pseudoplástico
F127-50IFN- γ	+ 2.943,86	Não-newtoniano: Tixotrópico Pseudoplástico

Tabela 13. Valores de viscosidade e característica do fluxo das dispersões pré-selecionadas (127-10 e F127-50) obtidos a partir dos dados das Figuras 31 e 34.

Dispersão ou formulação	Viscosidade Média (Pa . s)	Característica
F127-10	0,0021 \pm 0,0023	Não linear
F127-50	0,0030 \pm 0,0024	Não linear
F127-10IFN- γ	0,0022 \pm 0,0024	Não linear
F127-50IFN- γ	0,0034 \pm 0,0027	Não linear

No caso da amostra F127-250IFN- γ também foram realizadas análises reológicas em função da frequência, visando obter informações sobre a estrutura deste sistema.

A evolução dos módulos de armazenagem G' (módulo elástico/sólido elástico) e de perda G'' (módulo viscoso/líquido viscoso) em função da frequência para a dispersão F127-250, em diferentes temperaturas (5, 19 e 25°C) é mostrada na Figura 36, enquanto que para a formulação F127-250IFN- γ na Figura 37.

Observa-se na Figura 37 que as curvas obtidas à temperatura de 5°C para a dispersão F127-250 mostram um predomínio de G'' , mas G' está presente com valores em uma ordem de grandeza inferior, sugerindo que, nesta temperatura a dispersão comporta-se como um líquido. Enquanto que à temperatura de 19°C, para frequências, os valores de G' e G'' são muito próximos, mas com os de G' levemente maiores, situação que se inverte com aumento da frequência indicando que exatamente a esta temperatura ocorre a transição de estado líquido/sólido do sistema. As curvas obtidas para a temperatura de 25°C indicam que o número de interações aumentam, fazendo com que os valores de G' sejam maiores que G'' , e o sistema é caracterizado como sólido com característica predominantemente elástica, com características de gel sólido (Figura 36).

O comportamento dos módulos de armazenagem G' e de perda G'' em função da frequência da formulação F127-250IFN- γ em diferentes temperaturas (5, 19 e 25°C) é apresentado na Figura 37. Observa-se que na temperatura de 5°C há um predomínio de G'' e ausência de G' indicando que a amostra comporta-se praticamente como um sistema líquido viscoso, característico de soluções líquidas. Para maiores temperaturas 19 e 25 °C, as características de transição de estado líquido/sólido, e de sólido respectivamente foram mantidas.

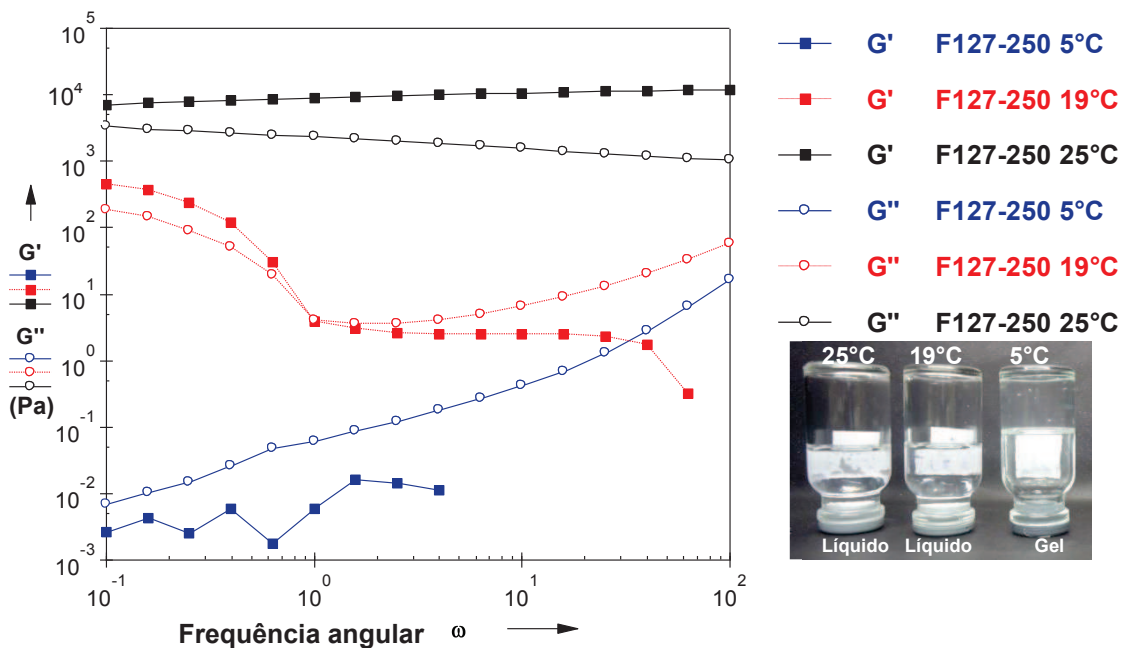


Figura 36. Comportamento dos módulos de armazenagem G' e de perda G'' em função da frequência da dispersão F127-250 bem como as respectivas imagens em diferentes temperaturas (5, 19 e 25°C).

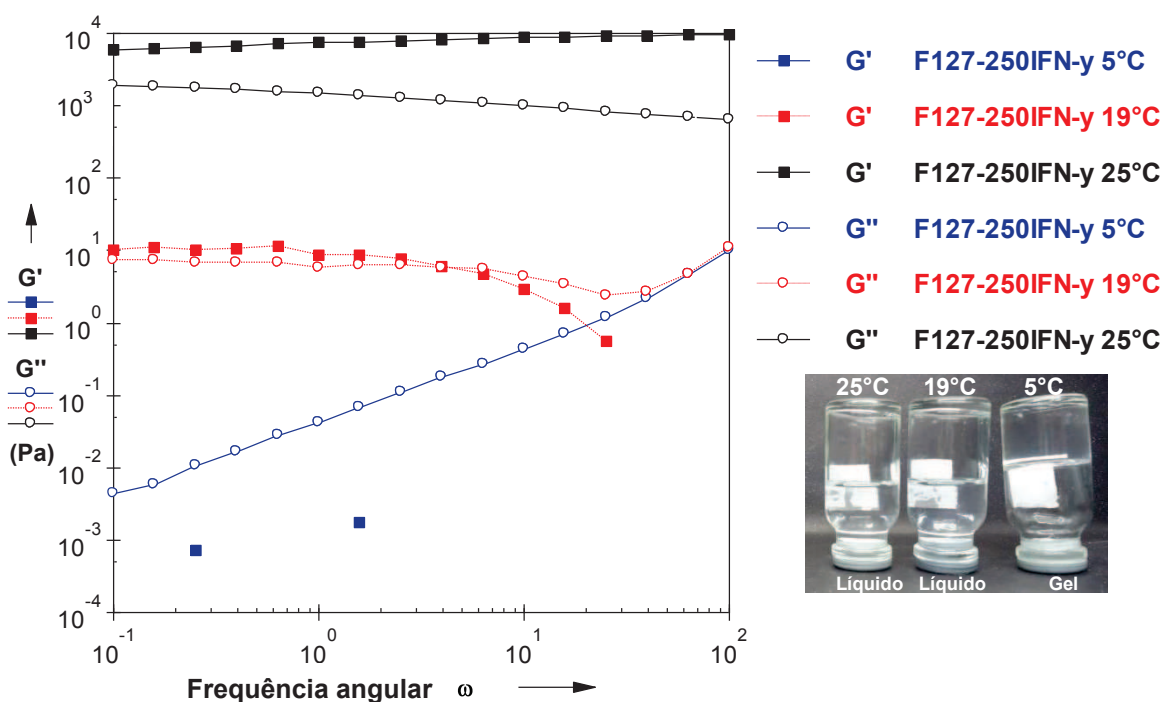


Figura 37. Comportamento dos módulos de armazenagem G' e de perda G'' em função da frequência da formulação F127-250IFN- γ bem como as respectivas imagens em diferentes temperaturas (5, 19 e 25°C).

O mesmo comportamento é observado para as formulações correspondentes (Figura 37) indicando que a incorporação do IFN- γ não influenciou nas características das dispersões. Em adição são apresentadas imagens das dispersões e formulações (Figuras 36 e 37) nas respectivas temperaturas de realização das análises. Observa-se que, para a temperatura de 5 °C o gel é mantido na parte superior do frasco.

As Figuras 38 e 39 apresentam a análise do ângulo de defasagem, ($\tan \delta$) dado pela razão entre G'' e G' para a dispersão F127-250, e para a formulação correspondente F127-250IFN- γ em diferentes temperaturas (5, 19 e 25°C), com o objetivo de verificar a viscoelasticidade dos sistemas, conforme foi discutido no capítulo 2.

Observa-se na Figura 38 valores de $\tan \delta \gg 1$ para a temperatura de 5°C, indicando que a dispersão F127-250 é essencialmente um líquido viscoso, enquanto que, para a temperatura de 19°C ocorre a transição sólido elástico/líquido viscoso. O perfil apresentado pela curva obtida à temperatura de 25°C se refere ao comportamento de um sólido elástico, pois $\tan \delta \ll 1$ (Figura 38).

Observa-se na Figura 39 que o perfil da curva obtida a 5°C valores de $\tan \delta > 10$, o que indica que a formulação F127-250IFN- γ a é essencialmente uma solução líquida, porém com menor viscosidade do aquela verificada para a dispersão. Para a curva obtida a 19°C observa-se também a ocorrência da transição sólido elástico/líquido viscoso, enquanto que, o perfil da curva a 25°C, indica que o comportamento sólido elástico foi mantido, visto que $\tan \delta \ll 1$.

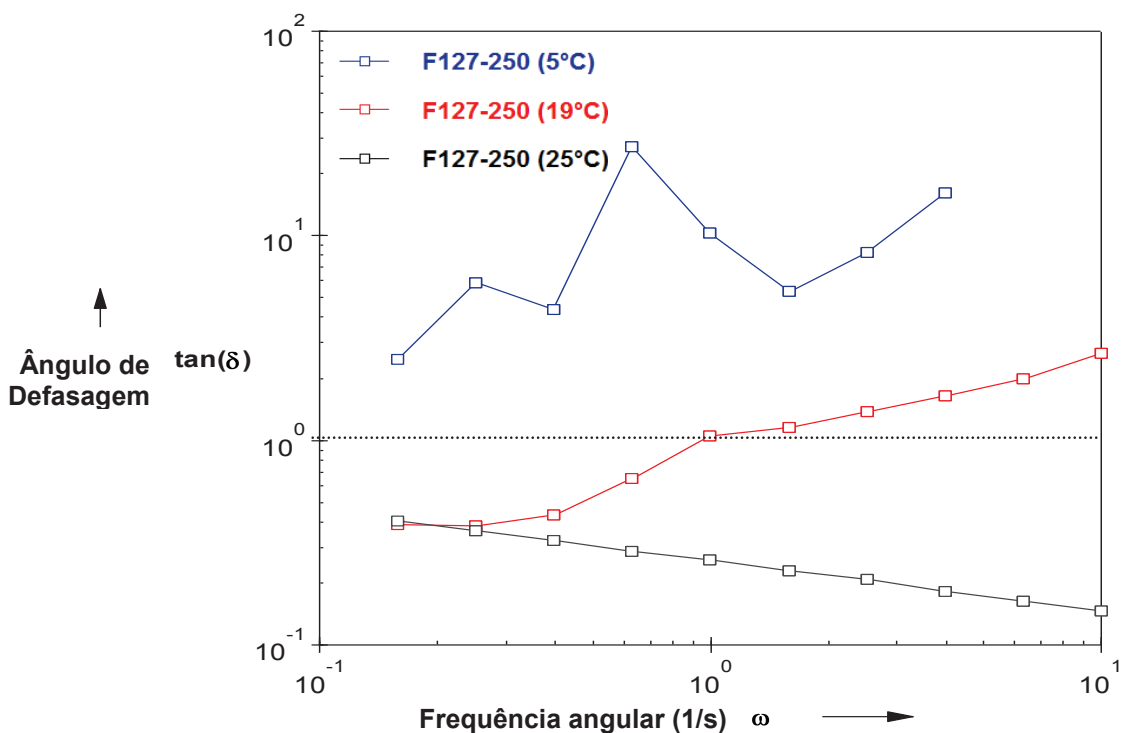


Figura 38. Curvas do ângulo de defasagem em função da frequência da dispersão F127-250 para diferentes temperaturas (5, 19 e 25°C).

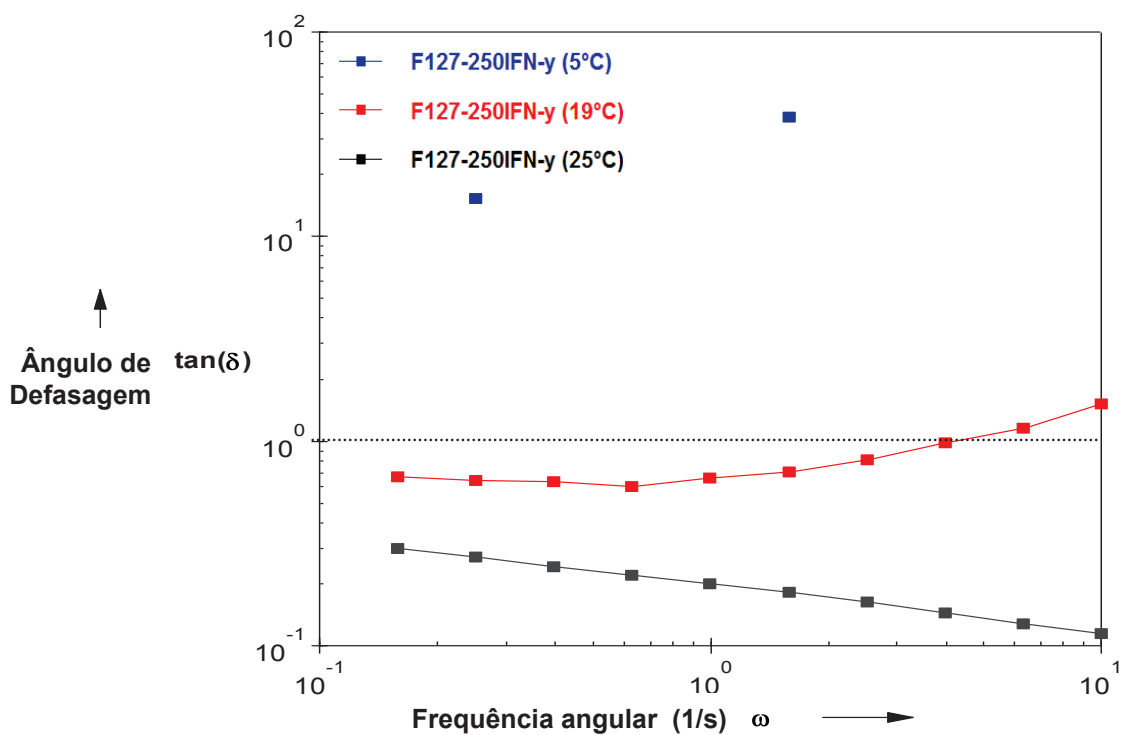


Figura 39. Ângulo de defasagem em função da frequência da formulação F127-250IFN- γ para diferentes temperaturas (5, 19 e 25°C).

O potencial deste sistema não foi negligenciado pois, apesar de reconhecer que sistemas com transição líquido/sólido tenham uma aplicação especial, considerou-se que este sistema não seria interessante para as aplicações biológicas que buscamos com este trabalho, e a formulação não foi descartada, apenas não foi considerada para avaliações posteriores.

7.2 Caracterização por espalhamento dinâmico de luz

A Figura 40 mostra as distribuições de tamanho das micelas das dispersões (F127-10 E F127-50) e das formulações (F127-10IFN- γ e F127-50IFN- γ), cujos dados estão listados na Tabela 14. A tabela apresenta os valores do potencial zeta (ζ), índice de polidispersividade (Pdi) e do diâmetro hidrodinâmico (D_H) médios das dispersões e formulações do sistema F127.

Observa-se na Tabela 14, que o potencial ζ das dispersões ou formulações do sistema F127 contendo ou não o IFN- γ , independente da concentração, é praticamente nulo, esperado para este sistema. Os valores de polidispersividade das dispersões são 0,8 e 0,48, enquanto, após a incorporação de IFN- γ , observa-se que o valor foi reduzido para a amostra de menor concentração de F127, e ficou praticamente constante para a de maior concentração (Tabela 14).

O tamanho hidrodinâmico das micelas ficou praticamente constante após a incorporação do IFN- γ , sendo que as partículas F127-10IFN- γ e F127-50IFN- γ apresentaram $D_H=26,42$ e $4,53$ nm, respectivamente (Tabela 14).

Os resultados obtidos da incorporação de IFN- γ em copolímeros que formam micelas indicaram que os sistemas micelares nanoestruturados apresentam comportamento não-Newtonianos, área de histerese expressiva, não

apresentam limite de escoamento e viscosidade não linear. Este tipo de perfil descreve os fluidos como do tipo pseudoplásticos com tixotropia, independente da presença de IFN- γ .

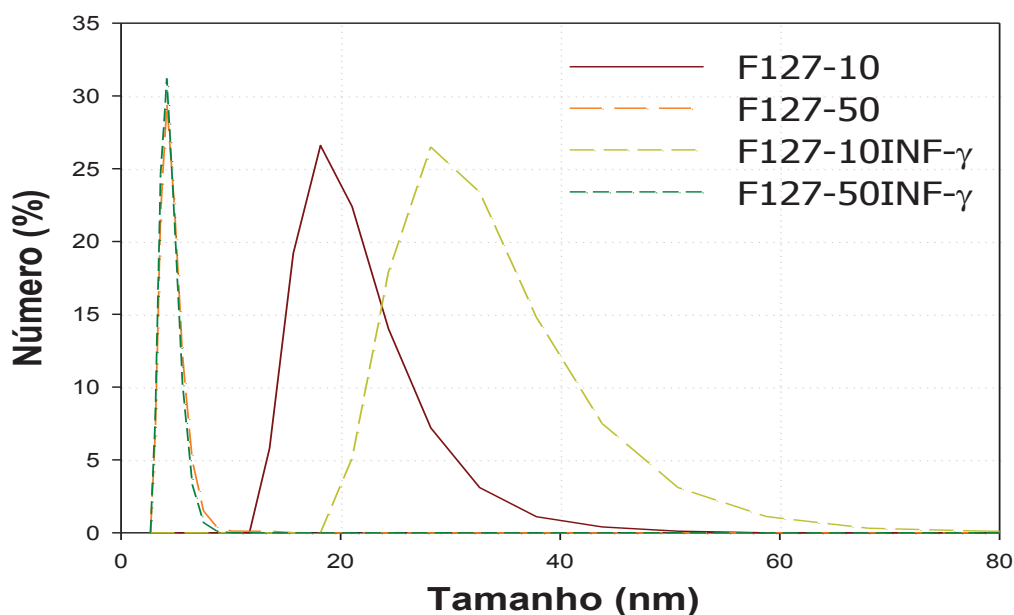


Figura 40. Distribuições de tamanho das micelas das dispersões (F127-10 e F127-50) e das formulações (F127-10IFN- γ e F127-50IFN- γ).

Tabela 14. Potencial zeta, índice de polidispersividade e diâmetro hidrodinâmico médios das dispersões (F127-10 e F127-50) e formulações (F127-10IFN- γ e F127-50IFN- γ). O índice de polidispersividade e diâmetro hidrodinâmico foram obtidos a partir da Figura 40.

Formulação	Ensaio		
	Potencial Zeta (mV)	Índice de polidispersividade	Diâmetro Hidrodinâmico (nm)
F127-10	-1,86	0.80	21,07
F127-50	- 2,17	0.48	4,24
F127-10IFN- γ	-1,54	0,33	26,42
F127-50IFN- γ	+2,95	0,54	4,53

A dispersão de F127 em 250 mg.mL^{-1} não apresentou capacidade de fluxo a $25 \text{ }^\circ\text{C}$. As análises oscilatórias indicam que este sistema apresenta comportamento de um sólido elástico. As formulações F127-10IFN- γ e F127-50IFN- γ apresentaram potencial ζ neutro e D_H de 26 e 5 nm, respectivamente.

Quando se comparou as dispersões ($n = 3$) e suas respectivas formulações (F127-10IFN- γ e F127-50IFN- γ) a veiculação do IFN- γ não alterou estatisticamente o D_H ($p > 0,05$), mas indicou a significativa diferença do D_H entre ambas as formulações ($p < 0.0001$). Ao comparar estes mesmos grupos o potencial ζ não foi significativamente modificado ($p = 0,1700$).

A partir destas avaliações, as formulações com perfis reológicos de líquido foram selecionadas para a realização de estudos posteriores de avaliação de estabilidade.

CAPÍTULO 8

8 RESULTADOS: CONTROLE DE QUALIDADE DAS FORMULAÇÕES PRODUZIDAS

Neste capítulo serão apresentados os resultados obtidos para o estudo de estabilidade das nanoemulsões 1NEP, 3NEP, 10NEB, 11NEB, dispersões poliméricas F127-10, F127-50, e formulações 1NEPIFN- γ , 3NEPIFN- γ , 10NEBIFN- γ , 11NEBIFN- γ , F127-10IFN- γ e F127-50IFN- γ desenvolvidas. Inicialmente serão relatados os dados físico-químicos de estabilidade preliminar e, posteriormente, os de estabilidade acelerada adicionados do monitoramento reológico, potencial zeta, diâmetro hidrodinâmico e dosagem de IFN- γ .

8.1 Estabilidade preliminar

Os resultados das análises físico-químicas dos sistemas NEP, NEB e F127 sob ciclos alternados de centrifugação em diferentes temperaturas (5 e 25 °C) são apresentados na Tabela 15. Cada um dos aspectos foram avaliados após a centrifugação a 25°C e posteriormente a 5°C, e ao iniciar e encerrar os 14 ciclos de 24 h cada alternados com temperatura de 5 e de 45°C. Os dados de condutividade e de pH também foram registrados.

Os resultados apresentados na Tabela 15 indicam que, independentemente do sistema, e do tratamento térmico, houve manutenção da estabilidade macroscópica independente da temperatura de centrifugação, assim como, a apresentação de aspecto translúcido e homogêneo durante todo o período do teste.

Tabela 15. Parâmetros obtidos por meio das análises físico-químicas antes e após a realização dos testes de estabilidade preliminar dos sistemas NEP, NEB e F127, com ou sem incorporação de IFN- γ .

NE, Dispersão ou Formulação	Centrifugação		Aspecto		Condutividade ($\mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$)		pH	
	~ 25°C	~ 5°C	Antes	Depois	Antes	Depois	Antes	Depois
1NEP	N	N	TL	TL	2,39	3,01	7,20	7,22
3NEP	N	N	TL	TL	2,26	2,52	7,40	7,50
1NEPIFN-γ	N	N	TL	TL	7,61	8,08	7,10	7,00
3NEPIFN-γ	N	N	TL	TL	7,20	7,25	7,20	7,00
10NEB	N	N	TL	TL	11,73	11,70	7,43	7,44
11NEB	N	N	TL	TL	9,32	8,84	7,48	7,45
10NEBIFN-γ	N	N	TL	TL	57,70	54,60	7,00	6,85
11NEBIFN-γ	N	N	TL	TL	11,31	13,04	7,15	6,80
F127-10	N	N	TL	TL	10,88	12,06	7,32	7,18
F127-50	N	N	TL	TL	10,02	10,25	7,27	7,18
F127-10IFN-γ	N	N	TL	TL	8,30	11,30	7,32	7,17
F127-50IFN-γ	N	N	TL	TL	10,75	11,16	7,28	7,19

Onde: N = Normal; TL = translúcido líquido; TG = translúcido gel; SF = separação de fases.

As nanoemulsões e formulações correspondentes após a incorporação de IFN- γ apresentaram valores de condutividade elétrica $>1,3 \mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$ o que as classifica como nanoemulsões do tipo O/A. Enquanto as micelas mantiveram condutividade em torno de $11,0 \mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$. Os valores de pH obtidos antes e ao final do teste de estabilidade, independente do sistema, permaneceram em torno de 7,0 (Tabela 15).

8.2 Estabilidade Acelerada

Os resultados das análises físico-químicas dos sistemas NEP, NEB e F127 sob condições extremas de temperatura estão apresentados na Tabela 16.

Tabela 16. Parâmetros obtidos por meio das análises físico-químicas antes (0) e após (45 e 90 dias) da realização dos testes de estabilidade acelerada das formulações relativas aos sistemas NEP, NEB e F127.

Formulação	pH		
	0	Tempo (dias)	
		45	90
1NEPIFN-γ	7,10 \pm 0,01	6,51 \pm 0,16	6,00 \pm 0,10
3NEPIFN-γ	7,00 \pm 0,05	6,22 \pm 0,49	6,68 \pm 0,36
10NEBIFN-γ	7,00 \pm 0,10	6,80 \pm 0,17	6,10 \pm 0,05
11NEBIFN-γ	7,20 \pm 0,10	6,40 \pm 0,35	5,84 \pm 0,35
F127-10IFN-γ	7,70 \pm 0,20	4,26 \pm 2,91	5,00 \pm 1,29
F127-50IFN-γ	7,80 \pm 0,10	5,94 \pm 0,91	5,50 \pm 0,12

Formulação	Condutividade ($\mu\text{S cm}^{-1}$)		
	0	Tempo (dias)	
		45	90
1NEPIFN-γ	6,74 \pm 0,10	7,72 \pm 0,54	7,81 \pm 0,18
3NEPIFN-γ	4,84 \pm 0,10	7,13 \pm 2,23	6,20 \pm 3,20
10NEBIFN-γ	37,80 \pm 0,20	42,37 \pm 1,24	41,63 \pm 2,32
11NEBIFN-γ	6,44 \pm 0,50	7,20 \pm 0,56	6,99 \pm 0,61
F127-10IFN-γ	10,10 \pm 0,30	11,23 \pm 0,45	10,92 \pm 1,72
F127-50IFN-γ	9,50 \pm 0,15	9,37 \pm 2,07	9,87 \pm 1,10

As formulações, independentemente do sistema, apresentaram translucidez e homogeneidade visual durante todo o período do teste, exceto a formulação F127-10IFN- γ que deixou de ser translúcida a partir de 30 dias.

Os valores obtidos para o pH das formulações apresentaram redução com o decorrer do estudo, mas mantiveram-se em torno de 6 após 90 dias, enquanto a condutividade elétrica manteve-se superior a $1,3 \mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$. Os dados para a formulação F127-10IFN- γ mostraram maior variação de pH e para a formulação 10NEPIFN- γ o valor da condutividade em torno de $40 \mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$ indica hidrofiliçidade bem superior à das outras formulações (Tabela 16).

A Figura 41 apresenta os dados de perfil médio das curvas de fluxo e de viscosidade das formulações desenvolvidas durante o período em que apresentaram mantiveram os seus respectivos perfis, quando se considera a análise estatística. Os dados foram obtidos a cada 45 dias seguindo-se as mesmas condições dos testes de caracterização reológica apresentados no capítulo 4.

Observa-se na Figura 41a por meio das médias de fluxo estatisticamente similares, que as formulações nanoemulsionadas apresentaram fluxo ascendente e descendente linear e sem variação significativa de perfil Newtoniano durante todo período avaliado (90 dias - 1NEPIFN- γ , 3NEPIFN- γ , 10NEBIFN- γ e 11NEBIFN- γ , $p > 0.05$), assim como a micela F127-50IFN- γ (90 dias, $p > 0.9874$), que também manteve perfil não-newtoniano. O perfil da formulação F127-10IFN- γ variou significativamente durante o período avaliado, porém estabilidade pelo período de 45 dias ($p = 0.9141$).

O perfil de viscosidade de cada formulação, apresentado por meio das médias no período de manutenção estatisticamente significativo, está registrado na Figura 40b, onde se observa que os perfis das formulações 3NEPIFN- γ e 10NEBIFN- γ variaram significativamente durante o período de estabilidade

acelerada, as quais apresentam estabilidade limitada a 45 dias ($p = 0.0654$ e 0.9921 respectivamente).

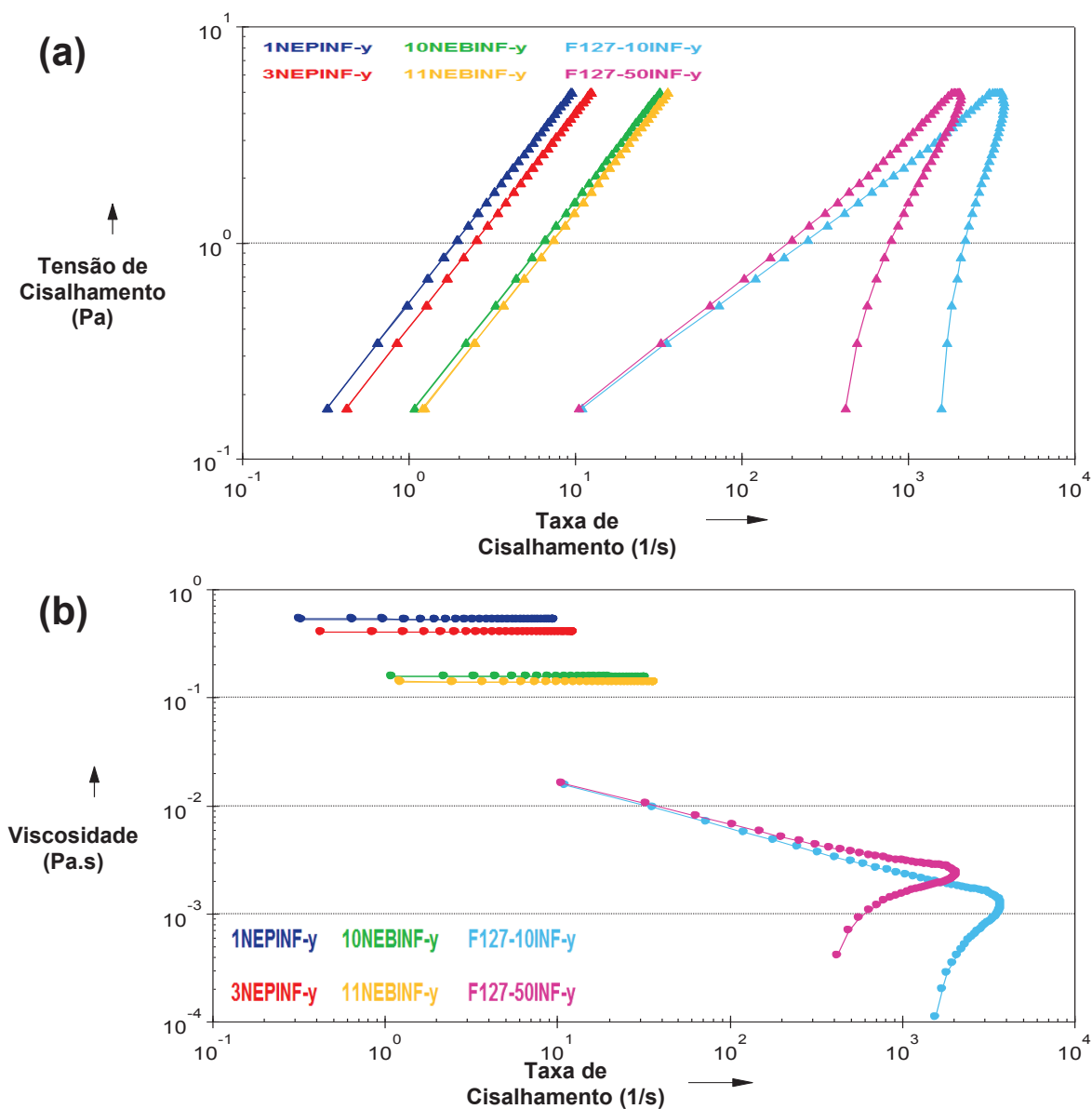


Figura 41. Curva de fluxo (a) e viscosidade (b) média das formulações durante o período de estabilidade apresentado por cada formulação (25°C).

*(a) 1NEPINF-y (90 dias; $p = 0.9880$); 3NEPINF-y (90 dias; $p = 0.5583$); 10NEBINF-y (90 dias; $p = 0.6723$); 11NEBINF-y (90 dias; $p = 0.9727$); F127-10INF-y (< 45 dias; $p = 0.9141$); F127-50INF-y (90 dias; $p = 0.9874$); (b) 1NEPINF-y (90 dias; $p = 0.1773$); 3NEPINF-y (< 45 dias; $p = 0.0654$); 10NEBINF-y (< 45 dias; $p = 0.9921$); 11NEBINF-y (90 dias; $p = 0.0791$); F127-10INF-y (90 dias; $p = 0.9999$); F127-50INF-y (90 dias; $p = 0.9998$).

As formulações 1NEPIFN- γ , 11NEBIFN- γ , F127-10IFN- γ e F127-50IFN- γ apresentaram perfil de viscosidade significativamente semelhante durante os 90 dias ($p > 0.05$).

Os valores registrados para as medidas de potencial zeta das formulações durante o período de estabilidade acelerada (0, 45 e 90 dias) são apresentados na Figura 42. Observa-se que os valores de potencial ζ das NEs mantiveram-se negativos e entre -30 e -40 mV e, praticamente, nulo para as micelares não apresentando variação significativa durante todo o período de estudo ($p > 0,05$). Em virtude das instabilidades nas medidas a formulação F127-10IFN- γ não foi avaliada em função do tempo (Figura 42).

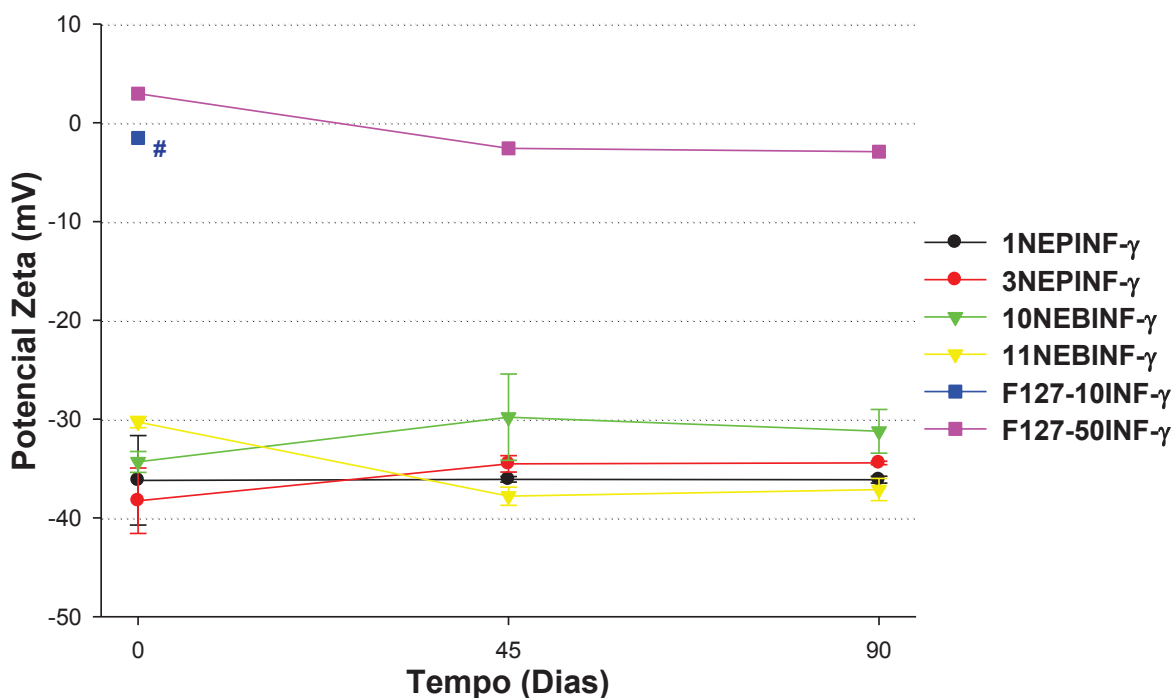


Figura 42. Valores de potencial Zeta das formulações produzidas durante o período de estabilidade acelerada (0, 45 e 90 dias).

*Comparando os tempos do teste, considerando o mesmo grupo. $F = 0.0015$, $p = 0.9985$; $F = 4.1834$, $p = 0.0727$; $F = 1.0515$, $p = 0.4077$; $F = 2.7495$, $p = 0.1418$; #Separação fases; $F = 3.8278$, $p = 0.0983$ (ANOVA).

A Figura 43 apresenta os valores médios do diâmetro hidrodinâmico das formulações produzidas obtidos durante o período de estabilidade acelerada (0, 45 e 90 dias).

Os diâmetros médios hidrodinâmicos das formulações 1NEPIFN- γ , 11NEBIFN- γ e F127-50IFN- γ não apresentaram variação significativa durante todo o período de estudo ($p > 0,05$) e médias de 301,56; 97,97 e 13,97 nm, respectivamente. Ao contrário, as formulações 3NEPIFN- γ e 10NEBIFN- γ apresentaram variações nos valores durante o período do estudo.

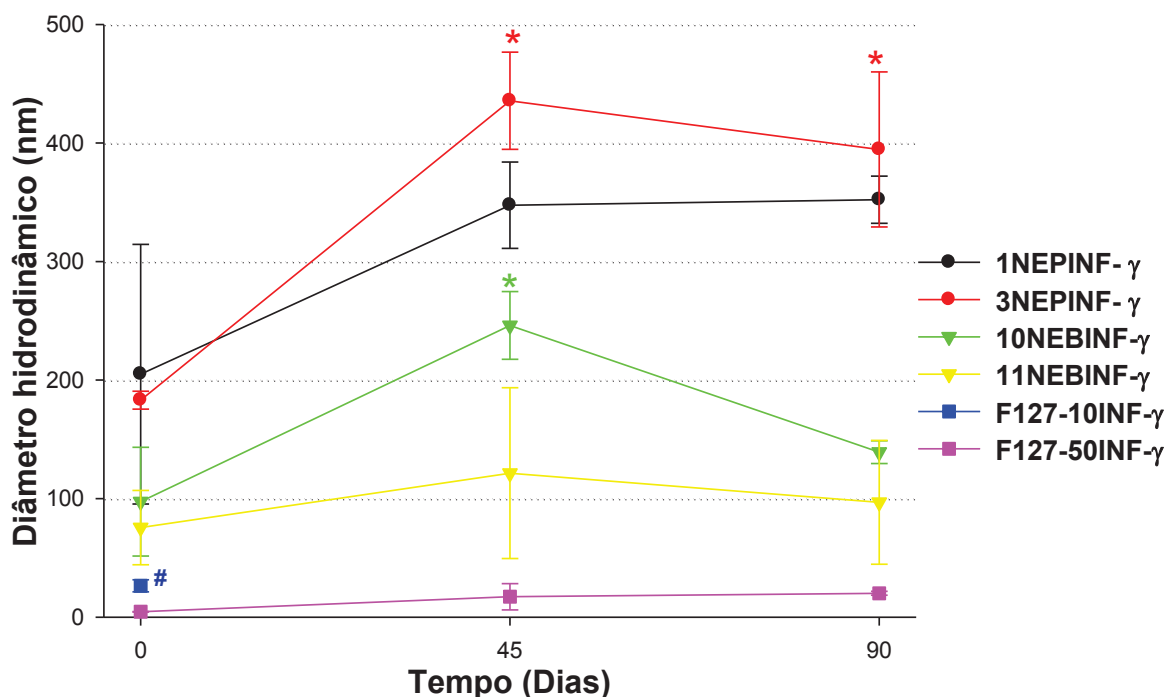


Figura 43. Valores médios de diâmetro hidrodinâmico das formulações produzidas durante o período de estabilidade acelerada (0, 45 e 90 dias).

*Comparando os tempos do teste, considerando o mesmo grupo. $F = 4,600$, (p) = 0.0600; $F = 27,4829$, $p < 0,01$; $F = 17,5779$, $p = 0,0038$; $F = 0,5340$, $p = 0,6151$; #Separação de fases; $F = 4,9425$, $p = 0,0538$ (ANOVA).

A avaliação da dosagem de interferon gamma incorporado às formulações durante o período de estabilidade acelerada é apresentada na Figura 44. Os dados da figura indicam que a concentração de interferon gamma apresentou tendência de redução ao longo do período do estudo em todas as formulações, contudo a formulação 1NEPIFN- γ , variou pouco em relação ao valor inicial (para 0), e as amostras 11NEBIFN- γ e F127-50IFN- γ não apresentaram variação significativa durante o período avaliado ($p > 0,05$) e médias de 90,87, 91,95 e 85,13 ng.mL⁻¹, respectivamente. A formulação 10NEBIFN- γ não manteve a dosagem adequada da citocina a partir de 45 dias.

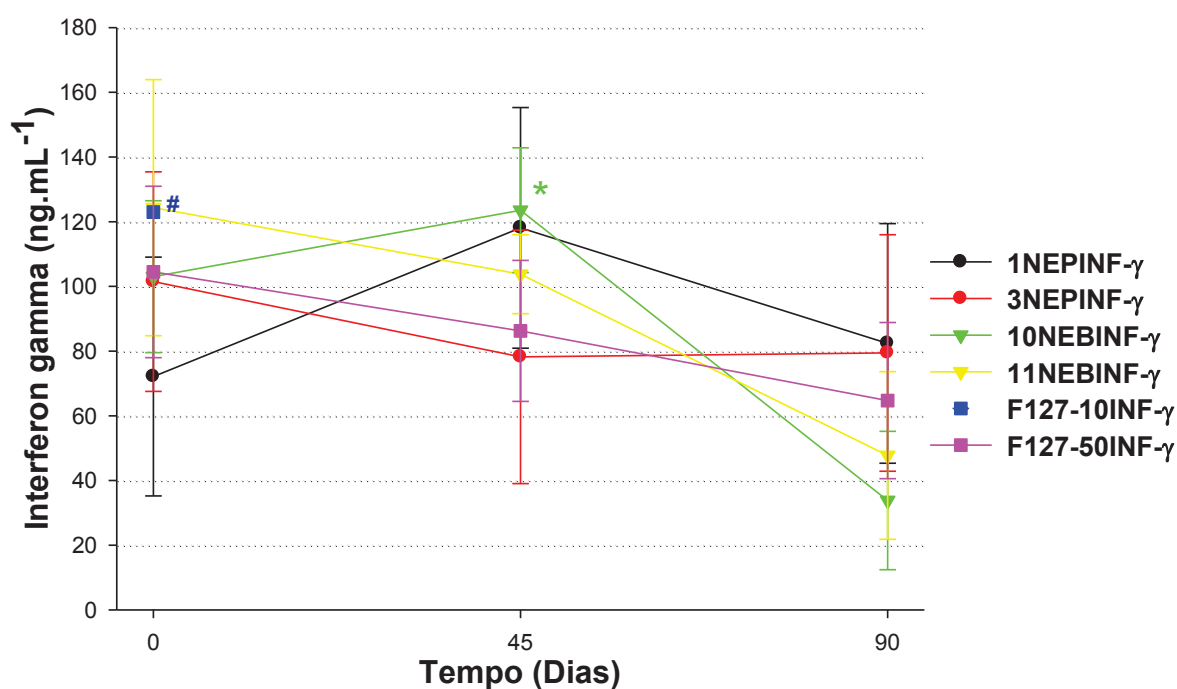


Figura 44. Dosagem de interferon gamma nas formulações durante o período de estabilidade acelerada.

*Comparando os tempos do teste, considerando o mesmo grupo. $F = 0.7956$, $p = 0.5035$; $F = 0.2675$, $p = 0.7768$; $F = 6.4788$, $p = 0.0414$; $F = 2.837$, $p = 0.1502$; Separação de fases; $F = 0.9336$, $p = 0.5334$ (ANOVA).

Das formulações avaliadas, 1NEPIFN- γ , 3NEPIFN- γ , 10NEBIFN- γ , 11NEBIFN- γ , F127-10IFN- γ e F127-50IFN- γ foram aprovados nos testes de estabilidade preliminar. As formulações 1NEPIFN- γ , 11NEBIFN- γ e F127-50IFN- γ apresentaram estabilidade em condições extremas durante 90 dias, apresentando pH biocompatível, manutenção significativa do perfil reológico, D_H , potencial ζ e dosagem do IFN- γ , apresentando-se adequadas para aplicações biológicas, ao considerarmos a possibilidade de administração parenteral, e foram empregadas para os ensaios biológicos.

CAPÍTULO 9

9 RESULTADOS: ENSAIOS BIOLÓGICOS

9.1 Ensaio Biológico

Neste capítulo serão apresentados os resultados obtidos dos ensaios biológicos realizados empregando-se as formulações 1NEPIFN- γ , 11NEBIFN- γ e F127-50IFN- γ . Os ensaios realizados foram: (i) avaliação de viabilidade celular; (ii) liberação de ânion superóxido; (iii) fagocitose; (iv) atividade microbicida; (v) avaliação da permeabilidade celular ao iodeto de propídio e (vi) de liberação de cálcio intracelular.

9.2 Índice de viabilidade

Os testes de índice de viabilidade celular dos fagócitos MN do sangue periférico humano tratados com diferentes formulações (1NEPIFN- γ , 11NEBIFN- γ e F127-50IFN- γ , e com controle PBS) e tempos de incubação (0; 0,5; e 24 h), são apresentados na Figura 45. Os fagócitos tratados com as formulações nanoemulsionadas apresentaram índice de viabilidade celular significativamente superior nos tempos de 0.5 e 24 h quando comparados aos outros grupos.

A viabilidade celular do grupo controle mostrou redução significativa após 24h de incubação, mesmo perfil apresentado pelo tratamento com NEPIFN- γ ($p < 0.05$). Enquanto que os grupos 11NEBIFN- γ e F127-50IFN- γ não apresentaram alteração da viabilidade celular em virtude do tempo de incubação.

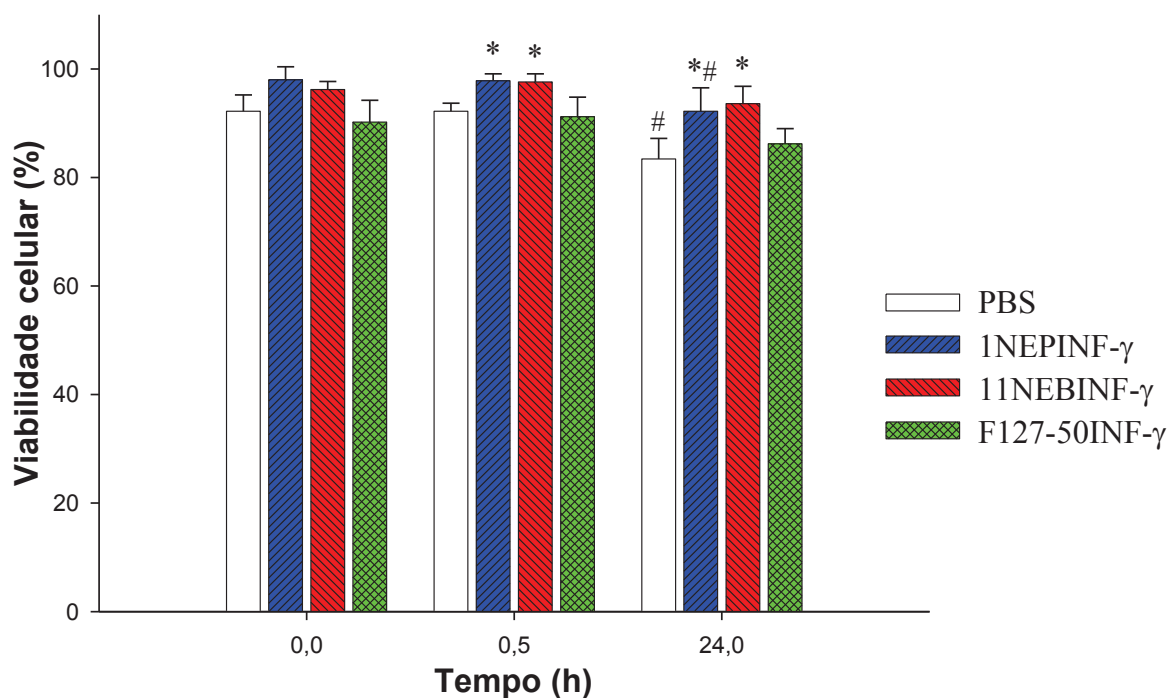


Figura 45. Índice de viabilidade celular dos fagócitos MN do sangue periférico humano com diferentes tratamentos (1NEPINF- γ , 11NEBINF- γ e F127-50INF- γ , e como controle o PBS) e tempos de incubação (0; 0,5; e 24 h).

*comparando o grupo controle (sem tratamento) com os grupos tratados considerando o mesmo tempo de incubação. $F = 12.8818$ e $p < 0.0003$; $F = 9.217$ e $p < 0.0012$ (ANOVA).

#comparando os tempos de incubação, considerando o mesmo tratamento. $F = 15.0661$, $p < 0.0001$ e $F = 4.5191$, $p < 0.0338$ (ANOVA).

9.3 Liberação de ânion superóxido

As avaliações da liberação do ânion superóxido pelas células do sangue periférico humano na presença bactéria e dos diferentes estímulos (1NEPINF- γ , 11NEBINF- γ e F127-50INF- γ , e como controles o IFN- γ , PBS, a dispersão F127-50, e as nanoemulsões 1NEP e 11NEB) e tempos de incubação (0; 0,5; 1 e 2 h) são apresentadas na Figura 46.

Quando os fagócitos MN foram tratados com as nanoemulsões contendo ou não o ativo, a liberação de ânion foi significativamente superior à espontânea (PBS) para todos os tempos. A liberação do ânion demonstrou não ser influenciada pela dispersão e formulação correspondente (F127-50INF- γ) desenvolvidas e pelo tempo de incubação (Figura 46).

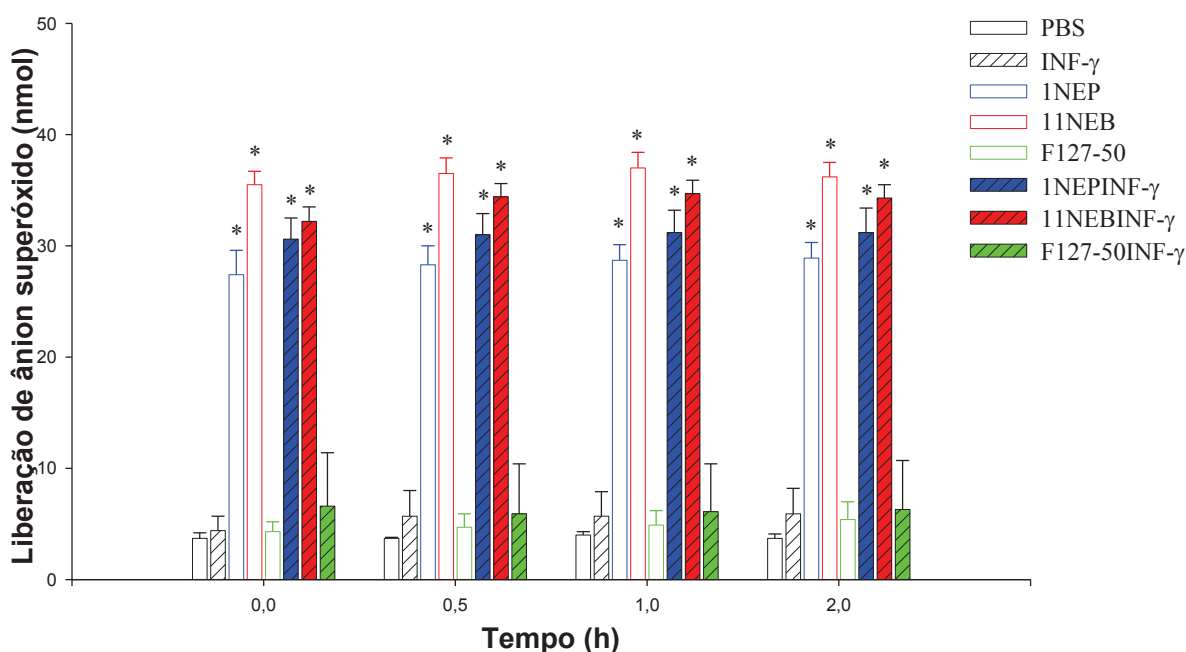


Figura 46. Liberação de ânion superóxido das células MN do sangue periférico humano na presença de *E. coli* em diferentes tratamentos (1NEPIFN- γ , 11NEBIFN- γ e F127-50IFN- γ , e como controles o IFN- γ , PBS, a dispersão F127-50, e as nanoemulsões 1NEP e 11NEB) e tempos de incubação (0; 0,5; 1 e 2 h). *comparando o grupo controle com os grupos tratados considerando o mesmo tempo de incubação. F = 226,4885, (p) < 0.0001; F = 242,7824, (p) < 0.0001; F = 259,3968, (p) < 0.0001; F = 235,3631 e (p) < 0.0001. Comparando os tempos de incubação, considerando o mesmo tratamento. F > 0,1 e (p) > 0,05 (ANOVA).

9.4 Avaliação da fagocitose

As avaliações da fagocitose da *E. coli* pelas células do sangue periférico humano na presença de diferentes estímulos (1NEPIFN- γ , 11NEBIFN- γ e F127-50IFN- γ , e como controles o IFN- γ , PBS, a dispersão F127-50, e as nanoemulsões 1NEP e 11NEB) e tempos de incubação (0; 0,5; 1 e 2 h) são apresentadas na Figura 47.

O IFN- γ estimulou significativamente a fagocitose nos instantes inicial (zero) e 0.5h de incubação, quando comparados aos índices observados para o grupo espontâneo (PBS). As células na presença da formulação 1NEP demonstraram aumento significativo na fagocitose apenas no tempo zero e a F127-50 não influenciou a fagocitose. Já a nanoemulsão 11NEB reduziu os índices de fagocitose, significativamente em 0.5h e 2h, comparando-se com os mesmos tempos do grupo espontâneo. As células tratadas com a formulação 1NEPIFN- γ foram significativamente estimuladas aumentando a fagocitose em todos os tempos de incubação. Para as formulações F127-50IFN- γ e 11NEBIFN- γ a fagocitose foi superior à observada para a espontânea exclusivamente nos tempos de incubação de 30 min e 1h, respectivamente.

Quando se compara os tempos de incubação para o mesmo tratamento, o IFN- γ estimulou a fagocitose significativamente com 0,5 h de incubação, enquanto que com as formulações 1NEPIFN- γ , 11NEBIFN- γ e F127-50IFN- γ apresentaram aumento significativo da fagocitose, para os tempos maiores do que 0,5 h, quando se compara ao grupo controle PBS (Figura 47).

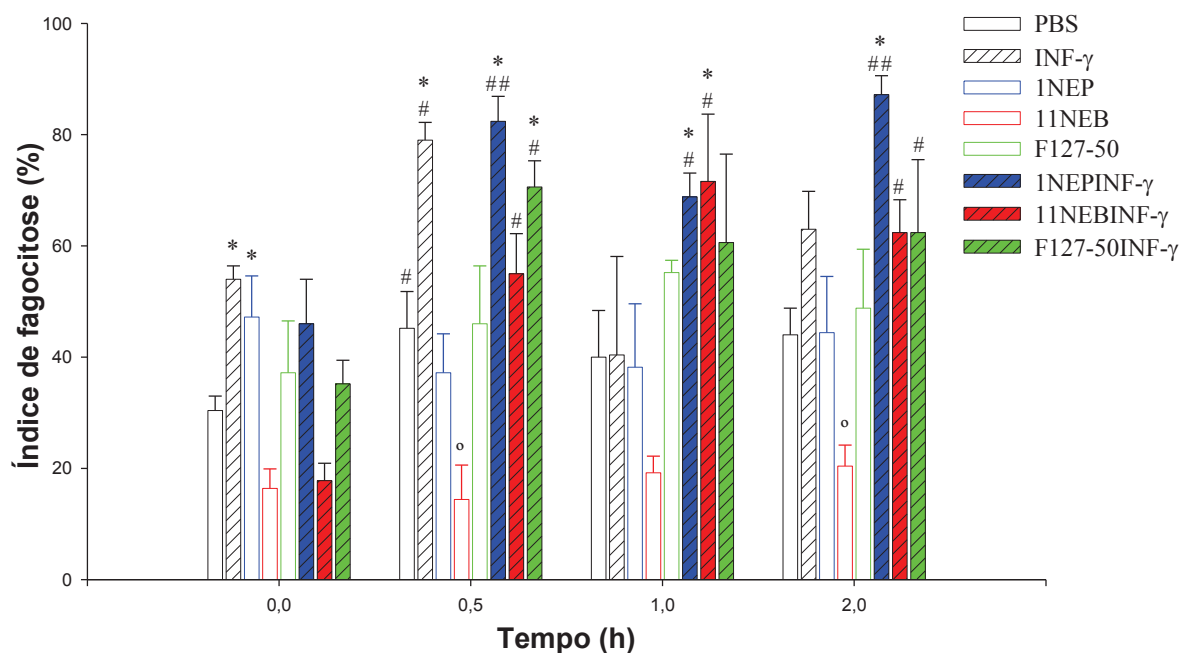


Figura 47. Índice de Fagocitose das células MN do sangue periférico humano na presença de *E. coli* em diferentes tratamentos (1NEPINF- γ , 11NEBINF- γ e F127-50INF- γ , e como controles o IFN- γ , PBS, a dispersão F127-50, e as nanoemulsões 1NEP e 11NEB) e tempos de incubação (0; 0,5; 1 e 2 h).

*o comparando o grupo controle (sem tratamento) com os grupos tratados considerando o mesmo tempo de incubação. F = 15.4535 e p < 0.0001; F = 33.0145 e p < 0.0001; F = 8.4092 e p < 0.0001; F = 16.3312 e p < 0.0001 (ANOVA).

#comparando os tempos de incubação, considerando o mesmo tratamento. F = 3.5475, p < 0.0379; F = 8.9250, p < 0.0013; F = 33.7026, p < 0.0001; F = 28.6823, p < 0.0013 e F = 5.4204, p < 0.0092 (ANOVA).

9.5 Atividade Microbicida

A atividade microbicida dos fagócitos do sangue periférico humano incubados com diferentes estímulos (1NEPINF- γ , 11NEBINF- γ e F127-50INF- γ , e como controles o IFN- γ , PBS, a dispersão F127-50, e as nanoemulsões 1NEP e 11NEB) e tempos de incubação (0; 0,5; 1 e 2 h) na presença de *E. coli* estão apresentados na Figura 48.

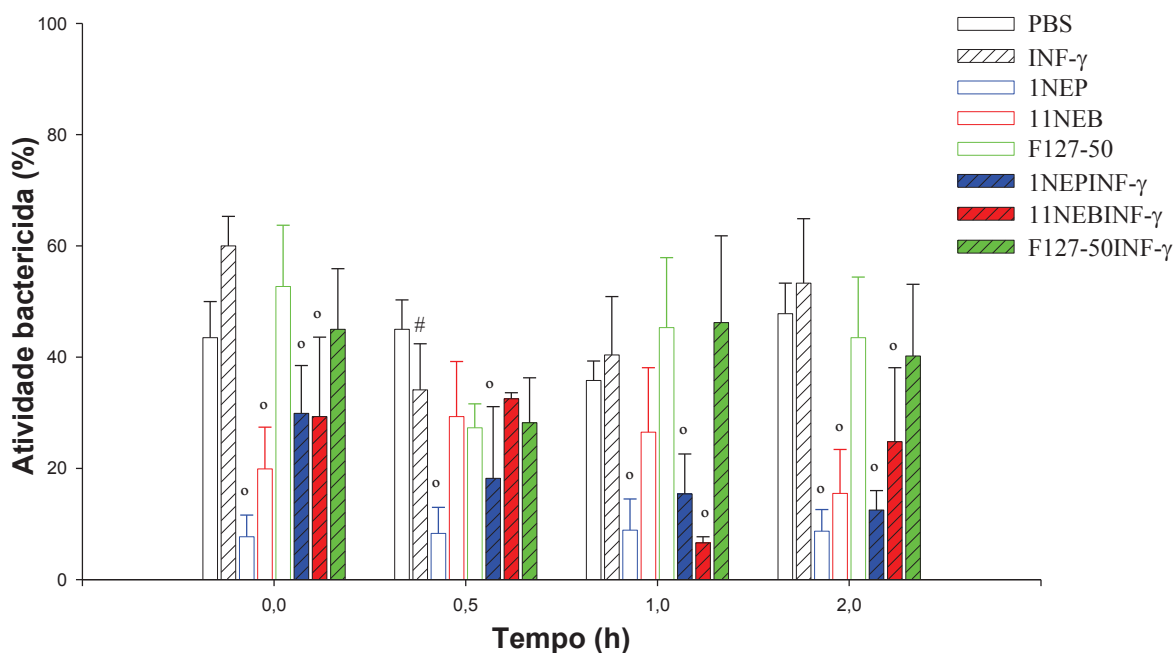


Figura 48. Atividade bactericida das células MN do sangue periférico humano na presença de *E. coli* em diferentes tratamentos (1NEPINF- γ , 11NEBINF- γ e F127-50INF- γ , e como controles o IFN- γ , PBS, a dispersão F127-50, e as nanoemulsões 1NEP e 11NEB) e tempos de incubação (0; 0,5; 1 e 2 h).

°comparando o grupo controle (sem tratamento) com os grupos tratados considerando o mesmo tempo de incubação. $F = 10.6760$ e $p < 0.0001$; $F = 4.7691$ e $p = 0.0012$; $F = 9.1092$ e $p < 0.0001$; $F = 10.4002$ e $p < 0.0001$ (ANOVA).

#comparando os tempos de incubação, considerando o mesmo tratamento. $F = 4.8064$, $p = 0.0142$; (ANOVA).

O as células tratadas com nanoemulsão, independentemente da presença do IFN- γ , reduziram a atividade microbicida em praticamente todos os tempos de incubação quando comparados aos fagócitos não tratados. Já a dispersão F127-50, bem como sua formulação, não influenciaram a atividade microbicida.

Os índices microbicidas não demonstraram diferença quando comparado os tempos de incubação, considerando o mesmo tratamento, exceto para o IFN- γ em 0.5 h (Figura 48).

9.6 Avaliação da permeabilidade celular ao iodeto de propídio

Os resultados da viabilidade por meio da permeabilidade celular ao iodeto de propídio dos fagócitos MN, de células MCF-7 de câncer de mama humano e da mistura dos mesmos, com os respectivos estímulos (1NEPIFN- γ , 11NEBIFN- γ e F127-50IFN- γ , e como controles o IFN- γ , PBS, a dispersão F127-50, e as nanoemulsões 1NEP e 11NEB) são apresentados na Figura 49.

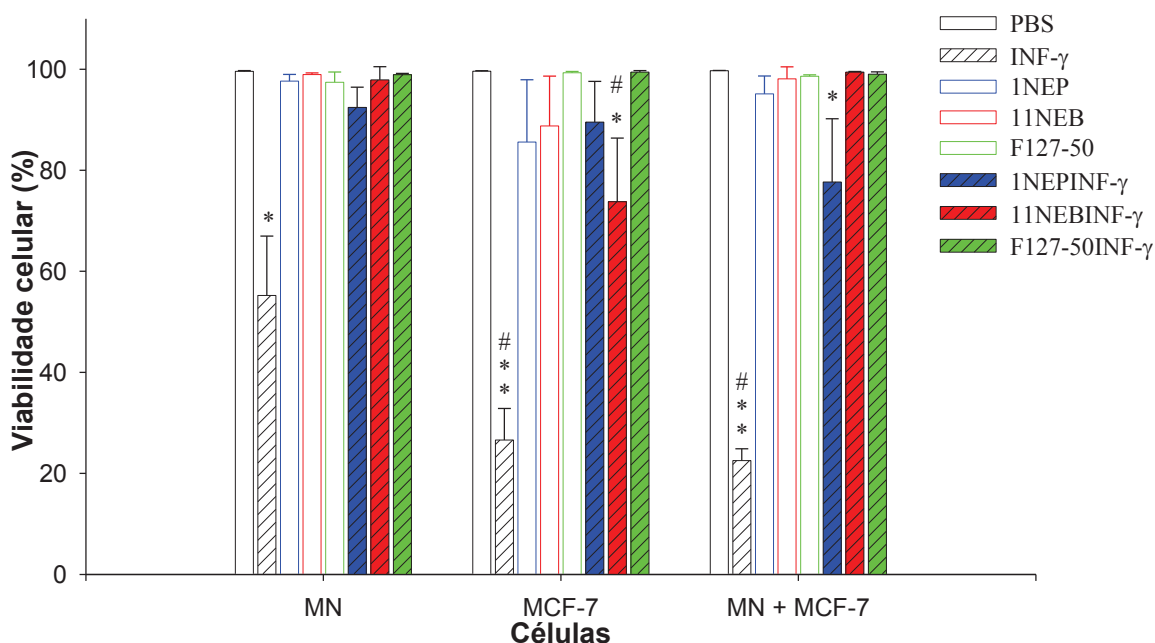


Figura 49. Índice de viabilidade celular dos fagócitos MN e das células MCF-7 de câncer de mama humano, e sua mistura, indicado pela intensidade de fluorescência média de permeabilidade celular ao iodeto de propídio, para os estímulos (1NEPIFN- γ , 11NEBIFN- γ e F127-50IFN- γ , e como controles o IFN- γ , PBS, a dispersão F127-50, e as nanoemulsões 1NEP e 11NEB).

*comparando o grupo controle (sem tratamento) com os grupos tratados considerando o mesmo tipo de células. F = 31.5700, F = 25.5800 e F = 55.6670 respectivamente e $p < 0.0001$ (ANOVA).

#comparando os diferentes tipos de células, considerando o mesmo tratamento. F = 13.3320, $p < 0.0019$; F = 10.2033, $p < 0.0042$ respectivamente (ANOVA).

O IFN- γ em solução foi capaz de promover a morte significativa dos fagócitos MN e das células MCF-7 de câncer de mama humano isoladas ou em associação com MN, quando comparados a todos os grupos. Além disso, comparando-se os diferentes grupos de células, a solução de IFN- γ foi específica na redução da viabilidade das células MCF-7 e da co-cultura comparando-se aos fagócitos MN (Figura 49).

As células MCF-7 de câncer de mama humano quando foram tratadas com a nanoemulsão 1NEPIFN- γ , sofreram uma redução de viabilidade, quando se compara com os outros grupos. Na comparação dos diferentes grupos de células, a nanoemulsão 1NEPIFN- γ foi específica na redução da viabilidade das células MCF-7 e na co-cultura quando se compara aos fagócitos MN. Em resumo, a formulação nanoemulsionada 11NEBIFN- γ foi capaz de promover a morte das células MCF-7 de câncer de mama humano e quando em co-cultura, quando comparada aos diferentes grupos celulares e também aos grupos controle tratados.

9.7 Liberação de cálcio intracelular

Os resultados de liberação de Ca²⁺ intracelular dos fagócitos MN e de células MCF-7 de câncer de mama humano, quando encubados com os respectivos estímulos (1NEPIFN- γ , 11NEBIFN- γ e F127-50IFN- γ , e como controles o IFN- γ , PBS, a dispersão F127-50, e as nanoemulsões 1NEP e 11NEB) são apresentados na Figura 50 e Tabela 17.

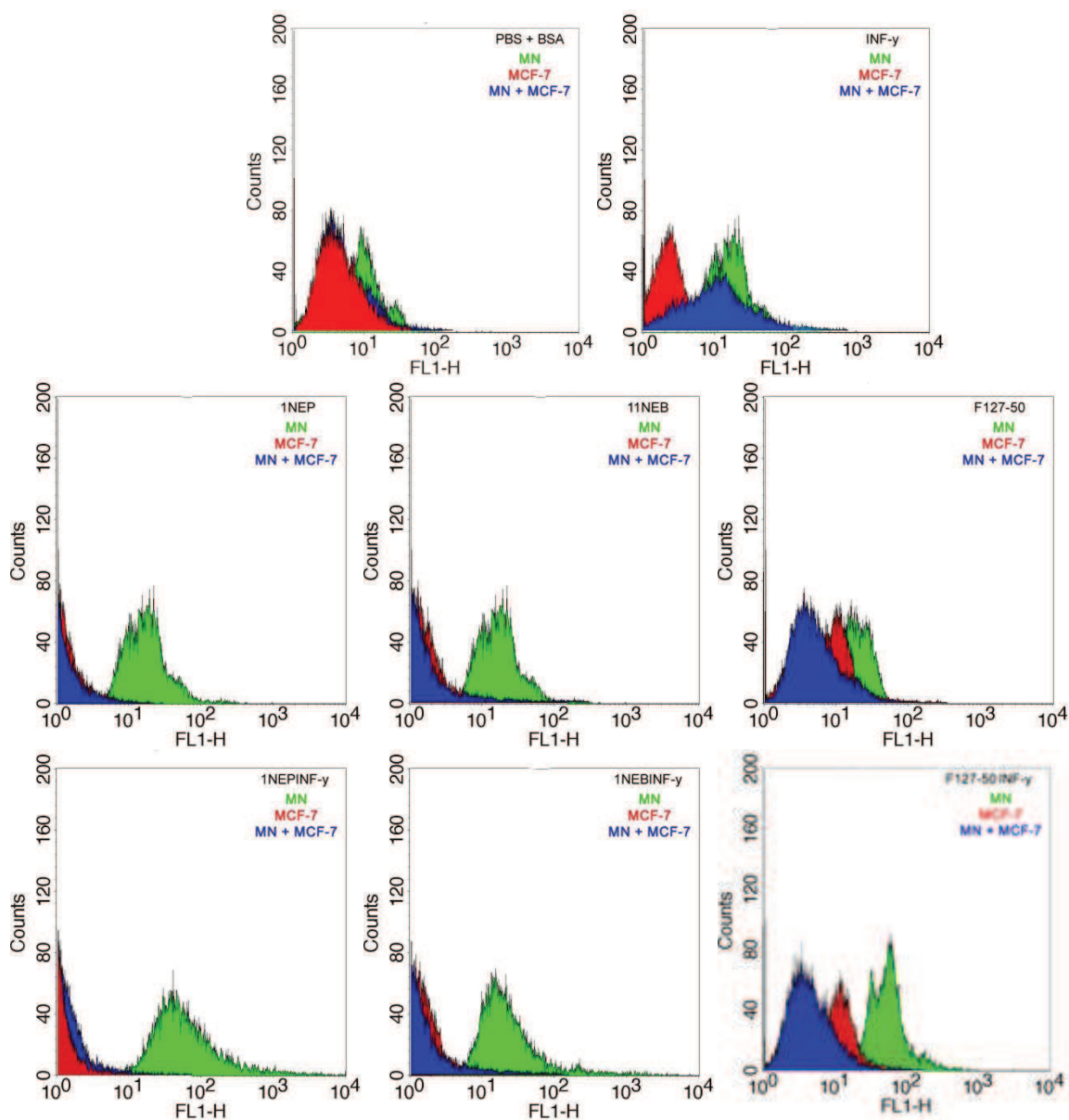


Figura 50. Liberação intracelular de Ca^{2+} dos fagócitos MN sanguíneos e das células MCF-7 de câncer de mama humano indicado pela intensidade de fluorescência.

Os fagócitos MN do sangue periférico humano quando tratados com as nanoemulsões 1NEPINF- γ , 11NEBINF- γ e a micela F127-50INF- γ , aumentaram a liberação de Ca^{2+} intracelular.

Tabela 17. Liberação intracelular de Ca^{2+} dos fagócitos MN e das células MCF-7 de câncer de mama humano indicado pela intensidade de fluorescência.

Formulação e controles	Intensidade de Fluorescência (%)		
	Fagócitos MN	Células MCF-7	Fagócitos MN + Células MCF-7
PBS + BSA	8.90 ± 3.5	5.93 ± 0.64 ^o	4.24 ± 0.30 [#]
IFN- γ	11.73 ± 3.9	3.29 ± 0.88	3.40 ± 0.36
1NEP	5.11 ± 1.9	1.48 ± 0.11	1.40 ± 0.10
11NEB	3.64 ± 1.5	1.48 ± 0.17	1.70 ± 0.38
F127-50	10.65 ± 3.5	5.94 ± 0.16 ^o	4.76 ± 0.52 [#]
1NEPIFN- γ	27.67 ± 15.4*	1.48 ± 0.15	1.38 ± 0.07
11NEBIFN- γ	15.48 ± 7.4*	1.44 ± 0.08	1.39 ± 0.06
F127-50IFN- γ	63.16 ± 18.0**	6.94 ± 0.96 ^{oo}	5.11 ± 0.85 ^{##}

Comparando o grupo controle (sem tratamento) com os grupos tratados. *F=10.2130, ^oF= 61.9800 e [#]F=42.8830, respectivamente e $p < 0.0001$ (ANOVA).

Houve redução na liberação de Ca^{2+} intracelular pelas células MCF-7 quando tratadas com as nanoemulsões, comparada à liberação dos grupos controle. Quando estas células foram tratadas pela micela F127-50IFN- γ se observou aumento de liberação de Ca^{2+} intracelular, quando se compara com os grupos controle PBS + BSA e IFN- γ .

A co-cultura de fagócitos MN com as células MCF-7 de câncer de mama tratadas com F127-50IFN- γ apresentaram o perfil de liberação de Ca^{2+} similar ao das células MCF-7 isoladas.

CAPÍTULO 10

10 DISCUSSÃO

No presente estudo foram desenvolvidas três novas formulações para veiculação de nanodoses da citocina interferon gamma com o objetivo de investigar a sua utilização como agente imunomodulador da atividade funcional dos fagócitos do sangue periférico e de células de câncer de mama humano. Foram produzidos dois tipos de sistemas nanoemulsionados (NEBIFN- γ e NEPIFN- γ) e o terceiro com micelas nanoestruturadas (F127-IFN- γ).

Conforme foi mencionado, apesar de as nanoemulsões, serem sistemas termodinamicamente instáveis, a otimização da mistura de tensoativos hidrofílicos e lipofílicos por meio do cálculo de EHL, tem levado a resultados consistentes que indicam a produção de NEs estáveis, apesar do valor de EHL ser um parâmetro empírico (BERNARDI et al., 2011; FERNANDES et al., 2014; FRYD; MASON, 2012; KABRI et al., 2011; LAWRENCE; REES, 2012). Neste trabalho empregou-se esta metodologia para obter nanoemulsões estáveis por no mínimo 90 dias.

A fração da mistura de tensoativos utilizada para o desenvolvimento das nanoemulsões, independentemente do co-tensoativo, na razão 3,5:5,5:1,0, proporcionou um valor de EHL igual ao requerido pelo triglicérides de ácido cáprico/caprílico. O ajuste do EHL requerido pela fase oleosa permitiu a diminuição do tamanho final da gotícula e resulta em sistemas com maior tendência a estabilidade, conforme se espera (HOUSAINDOKHT; POUR, 2012). Foi possível verificar que o emprego desta técnica possibilitou a obtenção de diagramas pseudoternários com amplas áreas relativas a sistemas estáveis, pois eles representam uma ferramenta para determinar em quais condições os sistemas translúcidos são formados e as proporções dos componentes relativos a

outros tipos de estruturas que também poderiam ser sintetizados (ABOOFAZELI et al., 1995; FRYD; MASON, 2012).

Neste trabalho, foram observadas grandes áreas de domínios de sistemas translúcidos na parte superior dos diagramas. Os resultados mostraram que proporções de tensoativo acima de 35 % para o sistema SP/TW/P e de 45 % para o SP/TW/B resultaram em NEs homogêneas e translúcidas, em acordo com os resultados encontrados na literatura (BERNARDI et al., 2011; PENG et al., 2010).

Nos diagramas obtidos para o sistema SP/TW/B observa-se uma região maior relativa aos sistemas nanoemulsionados quando se compara ao sistema SP/TW/P. O co-tensoativo B promoveu a formação de NEs com até 20 % de fase aquosa, já o co-tensoativo P limitou a formação a 15 %. A presença do co-tensoativo na formulação da nanoemulsão é importante para reduzir a concentração de tensoativos, melhorar a mobilidade das cadeias de hidrocarbonetos e permitir maior penetração do óleo na camada interfacial, conseqüentemente melhorando a eficiência de emulsificação (CHIME; KENECHUKWU; ATTAMA, 2014; LI et al., 2010).

Segundo dados da literatura, os diagramas pseudoternários são ferramentas importantes para a obtenção de sistemas translúcidos, no entanto, eles não garantem a estabilidade destes sistemas ao longo do tempo ou sob condições especiais, sendo necessária a realização de outros tipos de testes (RIBEIRO et al., 2015). Por exemplo, análises reológicas fornecem informações sobre os parâmetros relativos à estabilidade físico-química das nanoemulsões, obtendo-se dados relativos à estrutura do produto que permitem o acompanhamento de modificações decorrentes de processos de desestabilização (CHIME; KENECHUKWU; ATTAMA, 2014).

As propriedades reológicas de dispersões coloidais dependem do tipo, forma, densidade e número de componentes presentes na formulação, bem como das interações entre eles (FRYD; MASON, 2012). Assim, mudanças microestruturais interferem nas propriedades reológicas do sistema (ACHARYA; HARTLEY, 2012). No caso dos sistemas emulsionados translúcidos líquidos, eles exibem normalmente um comportamento newtoniano com viscosidade constante para uma grande faixa de taxa de cisalhamento (ACHARYA; HARTLEY, 2012; ROJAS et al., 2009) e, nos casos de géis, apresentam comportamento não-newtoniano com variação de viscosidade (PESTANA et al., 2008). Nesta investigação, os resultados obtidos da caracterização reológica das NEs indicaram que a maioria delas, bem como das formulações correspondentes, apresentaram perfil Newtoniano, sendo portanto adequadas para uma possível veiculação oral ou parental (SHARMA et al., 2010), que são as vias de administração mais indicadas para agentes imunomoduladores. Estas formulações também não apresentaram variações de viscosidade numa faixa de cisalhamento de no mínimo 0 a 20 1/s.

Para a otimização das formulações nanoemulsionadas considerou-se o comportamento Newtoniano com baixa viscosidade como condição para a seleção, visando possível aplicação parenteral, estas características são indicadas para formulações dedicadas a esta via de administração, uma vez que a administração de emulsões de alta viscosidade pode ser muito dolorosa para o paciente (BRUXEL et al., 2012).

As características reológicas das micelas nanonanoestruturadas (MNPs), e das formulações correspondentes, se mostraram diferentes daquelas obtidas para as NEs. As dispersões e formulações nanoestruturadas apresentaram perfil não-

newtoniano pseudoplástico com tixotropia. Por exemplo, os valores de viscosidade obtidos para as formulações F127-10IFN- γ e F127-50IFN- γ são pelo menos, mil vezes inferiores aos das nanoemulsões. Em adição elas também tiveram uma redução gradual e homogênea da viscosidade em função da temperatura para a faixa investigada.

Em resumo, as MNPs caracterizam-se como líquidos de viscosidade reduzida, mesmo apresentando comportamento não-newtonianas, são perfeitamente adequadas para a administração parental (SHARMA et al., 2010). Com exceção da formulação F127-250IFN- γ que apresentou variação grande de viscosidade a partir de 19°C, sendo um indicativo de alteração do estado físico. Adicionalmente, as avaliações oscilatórias e a análise do ângulo de defasagem mostraram que a amostra F127-250 é caracterizada como sólido com características predominantemente elásticas à temperatura ambiente, conforme se espera para sistemas à base de pluronic (NAMBAM; PHILIP, 2012; SHAHRIVAR; VICENTE, 2014; SOGA et al., 2005). Esta característica termo sensível do Pluronic-F127, foi empregada para otimizar a liberação sustentada de IL-1Ra com o objetivo de prolongar o seu potencial terapêutico (AKASH et al., 2012).

O estudo do comportamento de gelificação das formulações contendo os copolímeros carreadores de drogas é interessante para estabelecer parâmetros adequados para a aplicação das mesmas, uma vez que a transição sol-gel depende da temperatura. A temperatura na qual o gel é formado costuma ser referida como *temperatura de transição sol-gel*, $T_{\text{sol-gel}}$. Além disso, quanto maior a concentração de F127 presente na formulação menor é a temperatura relativa à gelificação (SHAHRIVAR; VICENTE, 2014). Neste trabalho observou-se para a

formulação F127-250IFN- γ $T_{\text{sol-gel}}$ de 19°C, em acordo com a literatura onde os valores de $T_{\text{sol-gel}}$ estão na faixa de 25 e 19°C considerando-se diferentes concentração (JONES et al., 2009; SHARMA et al., 2008).

Outro parâmetro importante é a temperatura micelar crítica (TMC) do copolímero, que é a temperatura a partir da qual, numa dada concentração, as moléculas começam a se agregar em micelas. O empacotamento micelar e a fração de volume devem estar relacionados ao mecanismo de formação do gel. À medida que a temperatura aumenta acima da temperatura micelar crítica, micelas são formadas, inevitavelmente aumentando a fração de volume ocupada pelos grupos constituintes das micelas (BOHORQUEZ et al., 1999; SONG et al., 2000). O aumento de temperatura implica em um aumento da fração de volume micelar, até que se atinja um valor crítico. A gelificação pode ser atribuída à desidratação dos grupos hidrofóbicos do copolímero no núcleo micelar, à variação do volume micelar (SONG et al., 2000) ou a um aumento no número de agregados (BOHORQUEZ et al., 1999). De acordo com a literatura, para o copolímero F127, a TMC para a formação de micelas é de 12°C (JEON et al., 2002; SONG et al., 2000). Portanto, em determinadas concentrações do copolímero, o aumento da temperatura promove um maior entrelaçamento das cadeias poliméricas contribuindo para a formação de géis (MARTINS et al., 2009).

O potencial do sistema F127-250 para veiculação de citocinas não foi negligenciado, no entanto, considera-se que sistemas com transição líquido/sólido tenham aplicação específicas, os quais no momento não foram contempladas nos objetivos deste trabalho.

A dispersão de luz é uma técnica de rotina para determinação do diâmetro hidrodinâmico (D_H), e a polispersividade de sistemas coloidais nanoestruturados

(FRYD; MASON, 2012). Em adição, o potencial zeta também é obtido no mesmo equipamento empregado para as análises EDL. Nossos resultados mostraram que o sistema NEP, independente da incorporação do ativo ou não, apresentou potencial ζ em torno de - 40 mV, polidispersividade entre 0,30 e 0,45, mas com tendência à redução do diâmetro das gotículas nas formulações com a incorporação do IFN- γ . A formulação 5NEP apresentou indicativo de desestabilização, pois apresentou D_H elevado e variação do potencial ζ , tendendo a zero para a formulação correspondente após a ultra homogeneização e incorporação do IFN- γ . Para as formulações selecionadas deste sistema, a 1NEPIFN- γ e a 3NEPIFN- γ , obteve-se valores de D_H iguais a 205 nm e 183 nm, com Pdi de 0,41 e 0,38, respectivamente.

As NEs e formulações do sistema NEB apresentaram valores de potencial ζ entre -30 e -40 mV, polidispersividade entre 0,20 e 0,45. Diferentemente do que ocorreu para o sistema NEP, com a incorporação do IFN- γ houve tendência a de aumento do valor do D_H . As formulações selecionadas 10NEBIFN- γ e 11NEBIFN- γ apresentaram D_H de 97,42 e 75,55 nm, respectivamente, ambas com Pdi 0,22, tendo sido escolhidas em virtude das menores variações de diâmetro hidrodinâmico, Pdi e perfil reológico satisfatório.

A pesar destas tendências de variação do D_H , após a incorporação de nanodoses do IFN- γ não houve modificações significativas e nem indicativo de clara relação com aumento ou diminuição do D_H para os sistemas nanoemulsionados, podendo as variações dos diâmetros hidrodinâmicos estar relacionadas com as forças iônicas de superfície indicadas pelo potencial ζ .

O potencial ζ negativo das formulações NEs poderia facilitar o acesso da molécula de IFN- γ à interface, devido à atração eletrostática, uma vez que o IFN- γ em pH neutro tende a apresentar carga positiva. Contudo, houve dificuldades de determinar sua presença na região dispersa, dispersante e /ou na interface em virtude da baixa concentração de IFN- γ .

Resultados de trabalhos realizados apontam que a interação entre a formulação e a proteína não deve conduzir a mudanças conformacionais ou permanentes para não causar efeitos biológicos indesejados, tais como a perda de atividade ou toxicidade. A adição de agentes tensoativos, tais como Tweens e Pluronic, resultou em um aumento da capacidade do IFN- γ permanecer bioativo (BAM; RANDOLPH; CLELAND, 1995). A interação entre o IFN- γ e os agentes tensoativos pode ser principalmente eletrostática, no entanto, a proteína pode ser parcialmente incorporada à porção hidrofóbica em função da presença de regiões hidrofóbicas na estrutura do IFN- γ (VAN SLOOTEN et al., 2000). Ambos mecanismos, podem desempenhar um papel importante na interação entre o IFN- γ , os tensoativos, a fase oleosa e aquosa e/ou copolímero F-127. Portanto, em função das características anfífilicas e da conformação tridimensional de moléculas proteicas, como o IFN- γ , o IFN- γ poderia estar disperso na fase tensoativa, também anfífilica, das nanoemulsões. Esta hipótese de interação proteína-tensoativo por meio de resíduos hidrofóbicos de ambas as moléculas, inclusive para micelas de F-127, já foi relatada na literatura (ENGLAND, 1999; PEC; WOUT; JOHNSTON, 1992) e acredita-se que em vários casos, a interação hidrofóbica seja mais importante do que a interação eletrostática (MANIASSO, 2001).

A grande quantidade de tensoativos, quando comparado à do IFN- γ poderia explicar o fato de que mesmo se o IFN- γ , carregado positivamente em pH 7, se associasse com a fase tensoativa por meio de interações eletrostáticas, não afetaria de forma significativa o potencial zeta negativo das nanoemulsões. Além disso, em virtude da baixa presença de IFN- γ na superfície das nanoestruturas se esperaria uma pequena influência da sua adição sobre o diâmetro hidrodinâmico, conforme foi observado para algumas das formulações.

É interessante mencionar resultados de IFN- γ encapsulado na matriz de nanopartículas de albumina resultando em formulações que visaram o controle de infecções causada por *Brucella sp.* (SEGURA et al., 2007) e do IFN- γ veiculado em lipossomas para atuação como adjuvante com vacinas antivirais (SLOOTEN et al., 2001) e anti-tumorais (SLOOTEN et al., 2000).

O sistema F127 independente da concentração do ativo é formado por micelas com tamanhos hidrodinâmicos de 26 e 5 nm, para os sistemas F127-10IFN- γ e F127-50IFN- γ , respectivamente. Estes dados estão de acordo com resultados descritos da literatura, mostrando micelas de F127 da ordem de 6 nm, e que a adição de substância ativa eleva de forma moderada o tamanho da micela (PY-DANIEL et al., 2016).

O potencial ζ desempenha um papel importante na estabilização de NEs, pois reflete o potencial superficial das gotículas. Este potencial depende do grau de ionização dos tensoativos e, portanto, do pH (BENITA; LEVY, 1993), tornando-se mais negativo com o aumento do pH. Os elevados valores de potencial ζ obtidos para as formulações nanoemulsionadas indicam que foram produzidas dispersões coloidais com características iônicas que impedem a coalescência

entre as gotículas, indicando estabilidade adequada (HONARY; ZAHIR, 2013; LAWRENCE; REES, 2012).

O valor negativo de ζ pode ser atribuído à possível presença de cargas superficiais negativas oriundas de grupos carboxilas e hidroxilas presentes na região polar das moléculas dos tensoativos tween e span 80, uma vez que a dissociação destas colaboram para o aumento do pH e conseqüentemente dos valores do potencial ζ .

Para as formulações NEPIFN- γ a interação eletrostática do IFN- γ , positivamente carregado a pH 7, com os sistemas nanoemulsionados 1NEP e 3NEP pode ter sido mais eficaz. Os valores do potencial ζ das nanoemulsões 1NEP e 3NEP iguais a -37,96 e - 41,27 mV, respectivamente diminuíram após a incorporação do IFN- γ , obtendo-se valores de -34,43 e -38,00 mV para as formulações 1NEPIFN- γ e 3NEPIFN- γ , respectivamente. Porém, no caso das formulações NEBIFN- γ os resultados não indicaram o mesmo tipo de interação, obtendo-se para as NEs 10NEB e 11NEB, valores de ζ iguais a -32,30 e - 28,30 mV, respectivamente, os quais após a incorporação de IFN- γ tiveram uma variação menor, aumentando para -33,70 e -30,30 mV para as formulações 10NEBIFN- γ e 11NEBIFN- γ , respectivamente. Adicionalmente, no caso dos sistemas F127, os resultados indicaram que pode ter ocorrido algum tipo de interação eletrostática do IFN- γ com as dispersões F127-10 e F127-50 pois os valores do potencial ζ iguais -1,86 e -2,17 mV, obtidos antes da incorporação de IFN- γ diminuiu para a formulação F127-10IFN- γ e ficou positivo para a F127-50IFN- γ (-1,54 e +2,95 mV, respectivamente).

Os copolímeros em bloco, apresentam caráter anfifílico em solução aquosa e tendem a se concentrar nas interfaces do sistema por adsorção visando reduzir a energia livre do sistema onde se encontram. À medida que a concentração do copolímero aumenta em uma solução, as interfaces do sistema começam a se saturar, e a estabilização do sistema pode continuar por meio da formação de micelas. Conforme foi mencionado, os copolímeros em bloco possuem a capacidade de se organizar em solução, para certas faixas de concentração e temperatura, formando estruturas micelares. A concentração em que há formação de micelas é denominada concentração micelar crítica (CMC). Portanto, a formação das micelas estáveis em solução aquosa é impulsionada pela hidrofobicidade das porções apolares de suas moléculas, e pela hidrofiliabilidade das porções polares (MANIASSO, 2001; ROSEN, 2004; ZHOU et al., 2011). As micelas não são estáticas, elas existem dentro de uma dinâmica de equilíbrio, simplesmente como um agregado dinâmico (MANIASSO, 2001). Este comportamento poderia explicar os valores dos índices de polidispersividade acima de 0,3 apresentados pelas dispersões F127-10 e F127-50, bem como para as formulações F127-10IFN- γ e F127-50IFN- γ . Em adição, no caso dispersão F127-10, a concentração do copolímero (10 mg.mL^{-1}), é próxima dos limites da concentração micelar crítica (CMC), podendo influenciar no aumento da polidispersividade. Na formação micelar a diminuição da tensão superficial ocasiona uma diminuição da entropia, neste caso considera-se a energia livre de Gibbs menor do que zero o que permite a estabilidade termodinâmica das micelas nanoestruturadas preparadas em soluções aquosas como as de PBS (WANG et al., 2014). Portanto, as formas micelares e livres das moléculas do copolímero

Pluronic estão organizadas em um equilíbrio dinâmico para formar micelas estericamente estabilizadas com reduzido potencial zeta (AGARWAL et al., 2007).

A redução do índice de polidispersividade a partir da homogeneização do meio é um processo esperado durante a síntese de nanoemulsões, visto que elas dependem do tipo de agitação empregado e da ordem de adição dos componentes (GHOSH et al., 2013), o que também se reflete no tamanho das gotículas. As nanoemulsões preparadas apresentaram diâmetro hidrodinâmico superior aos das micelas nanoestruturadas, o que está de acordo com dados da literatura (BONIFÁCIO et al., 2014; KIM et al., 2014; ONOUE; YAMADA; CHAN, 2014; SMITH et al., 2013). Observa-se na literatura resultados sobre o desenvolvimento de nanoemulsões com gotículas da ordem de 100 nm ou inferior (BERNARDI et al., 2011; CHIME; KENECHUKWU; ATTAMA, 2014; PRATAP et al., 2012) e micelas com tamanhos na faixa de 5 nm (NAMBAM; PHILIP, 2012).

Além dos aspectos reológicos, das técnicas de espalhamento de luz, as avaliações físico-químicas de estabilidade fornecem informações que indicam o grau de estabilidade relativa de um produto em diversas condições (PESSOA et al., 2014; RIBEIRO et al., 2015). Por exemplo, o teste de centrifugação permite avaliar a estabilidade de formulações, mas deve ser considerado como teste de triagem, pois permite a observação de separação de fase que ocorre quando um sistema é submetido a diferentes condições gravitacionais (RIBEIRO et al., 2015). Todas as formulações, independente do sistema e da temperatura, preliminarmente mostraram estabilidade macroscópica após a centrifugação, assim como, aspecto translúcido e homogêneo durante todo o período dos testes, o mesmo ocorreu com as formulações incorporadas com IFN- γ resultando em NEs e dispersões estáveis (TADROS et al., 2004).

As propriedades físico químicas das dispersões coloidais tais como a o pH e a condutividade elétrica, os quais fornecem informações sobre a estabilidade de dispersões coloidais, podem variar com tratamentos térmicos (MARTIN; SINKO; SINGH, 2011; RIBEIRO et al., 2015). As formulações sintetizadas foram consideradas estáveis após testes de resfriamento e/ou aquecimento. Os resultados não mostraram grandes variações de valores de pH e condutividade elétrica após o estresse térmico e as formulações, independente do sistema, apresentaram translucidez e homogeneidade visual durante todo o período de realização dos testes de estabilidade acelerada. O pH das formulações apresentaram redução com o decorrer do estudo, mas mantiveram-se na faixa 5,5 e 7,5. A condutividade elétrica manteve-se superior a $1,3 \mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$. As alterações de pH observadas não foram suficientes para alterar a integridade das nanoemulsões, as quais mostraram-se biocompatíveis, uma vez que no organismo humano encontra-se valores que oscilam entre 4,5 a 7,0, dependendo da região anatômica do tecido (ANSARI, 2009). Adicionalmente, as alterações na condutividade não foram significativas e não afetaram o diâmetro das gotículas das nanoemulsões estáveis (BERNARDI et al., 2011). Porém, pode-se afirmar que a manutenção da condutividade elétrica é um indício da estabilidade de emulsões, mas não deve ser considerado como fator determinante, pois a relação entre a variação da condutividade e a instabilidade das mesmas não é linear (BERNARDI et al., 2011; MASMOUDI et al., 2005).

Os principais processos envolvidos com a estabilidade das NEs são a cremação, floculação e coalescência. A estabilidade destes sistemas pode ser alcançada por meio de dois mecanismos principais, a estabilização estérica e a eletrostática. A estabilização eletrostática ocorre devido às forças de repulsão

entre as gotículas, o que promove uma maior estabilidade frente às forças de atração, tendo em vista que por apresentarem mesma constituição elas apresentam cargas superficiais semelhantes (CAPEK, 2002). Este mecanismo pode ser observado nas amostras de NEs e formulações sintetizadas com base no potencial zeta elevado durante todo período de estabilidade acelerada. Adicionalmente, a estabilidade estérica se torna importante quando são empregados tensoativos não iônicos na superfície, como os utilizados neste trabalho. A alta estabilidade coloidal das NEs pode ser também entendida a partir de sua estabilização estérica, por meio da redução dos efeitos de coalescência sobre o sistema. Além disso, o movimento browniano presente nessas formulações supera os efeitos da força de gravidade atuantes nessas gotículas (TADROS et al., 2004). O tamanho reduzido dos glóbulos dificulta a deformação destes, diminuindo ainda mais a instabilidade por coalescência. A pequena espessura do filme interfacial, em comparação ao tamanho dos glóbulos, dificulta o rompimento desses glóbulos por redução natural deste filme (FERNANDEZ et al., 2004; SOLANS et al., 2005).

Considerando-se os resultados que disponíveis na literatura, este estudo é pioneiro na realização de estudos de estabilidade de micelas. Os resultados mostraram que a formulação F127-10IFN- γ teve sua translucidez reduzida a partir de 30 dias de tratamentos térmicos, instabilidade esta, confirmada posteriormente pela variação dos perfis reológicos.

O monitoramento das características reológicas, em função do tempo, tem se mostrado uma ferramenta importante para a determinação da estabilidade de sistemas emulsionados (COTRIM; HONORIO-FRANÇA; FRANÇA, 2016; RIBEIRO et al., 2015). Formulações emulsionadas que mantêm o perfil de fluxo e

viscosidade constantes durante o estudo de estabilidade têm sido consideradas estáveis, mesmo em condições extremas (COTRIM; HONORIO-FRANÇA; FRANÇA, 2016; PESSOA et al., 2014). Neste trabalho, as nanoemulsões apresentaram fluxos sem variação do perfil Newtoniano durante todo o período avaliado, assim como a formulação F127-50IFN- γ manteve o seu perfil não-newtoniano. As formulações 1NEPIFN- γ , 11NEBIFN- γ e F127-50IFN- γ não apresentaram variações em seus perfis de viscosidade durante os 90 dias de avaliação. Enquanto que, a variação do perfil de viscosidade das formulações 3NEPIFN- γ e 10NEBIFN- γ limitaram a estabilidade delas a um período inferior a 45 dias. Os resultados indicam que o perfil de fluxo é o agente limitante da estabilidade de sistemas nanoemulsionados, enquanto que para os sistemas micelares os limites de estabilidade podem ser indicados por meio de variação do perfil de viscosidade.

Os valores registrados para o D_H das formulações 1NEPIFN- γ , 11NEBIFN- γ e F127-50IFN- γ se mantiveram praticamente constantes em função dos tratamentos térmicos. Adicionalmente, os valores de potencial ζ das nanoemulsões mantiveram-se em valores negativos elevados indicando as características iônicas por longo período, não havendo coalescência entre as gotículas (HONARY; ZAHIR, 2013). A redução da carga resultante, em módulo, da ordem de 40 mV para valores inferiores a 25 mV tende a provocar um aumento na taxa de floculação e coalescência das formulações (ROLAND et al., 2003), conforme ocorreu no caso da amostra 5NEP quando o IFN- γ foi incorporado.

Os dados de tamanho hidrodinâmico são um bom indicativo de estabilidade de formulações, pois um rápido aumento no tamanho do glóbulo indica baixa

estabilidade do sistema (BERNARDI et al., 2011). Portanto, a manutenção do D_H , em todas as condições de temperatura, observados para os sistemas desenvolvidos, são indicativos de alta estabilidade.

Com relação aos valores obtidos para a concentração de IFN- γ nas formulações preparadas, apesar da tendência de redução ao longo do período do estudo, eles foram mantidos constantes para 1NEPIFN- γ , 11NEBIFN- γ e F127-50IFN- γ , mesmo em temperaturas extremas, o que não foi verificado para a 3NEPIFN- γ . Esta determinação específica de IFN- γ por citometria indica que nas formulações estáveis o mesmo permanece com sua estrutura conformacional íntegra e a literatura relata que a ausência da manutenção da integridade da estrutura das proteínas é uma das desvantagens encontradas durante o desenvolvimento de sistemas de veiculação de citocinas (SEGURA et al., 2005).

As avaliações físico-químicas, reológicas, por espalhamento de luz e dosagem do ativo, em conjunto, indicam que as formulações otimizadas são as: 1NEPIFN- γ , 11NEBIFN- γ e F127-50IFN- γ , pois apresentaram estabilidade por longo período, o que as credenciaram para os estudos biológicos.

Um aspecto relevante na utilização de nanomateriais é o aspecto citotóxico dos novos sistemas desenvolvidos, mesmo que, quando em suas formas “bulk” tenham dados toxicológicos conhecidos (NEL et al., 2006). A viabilidade dos fagócitos foi investigada por meio do protocolo que emprega o alaranjado de acridina e microscopia de fluorescência. Verificou-se que a viabilidade dos fagócitos não sofreu danos após a incubação com as nanoestruturas desenvolvidas. Independentemente do tempo de incubação, os dados de

viabilidade celular dos grupos tratados mantiveram-se iguais ou superiores a do grupo controle.

A avaliação de danos ao DNA e RNA de formulações encubadas com 1NEPIFN- γ , 11NEBIFN- γ e F127-50IFN- γ por meio método do alaranjado de acridina e corante fluorocromo vital metacromático (FRENSTER, 1971; SMITH; ROMMEL, 1977) permitiu concluir que os nanosistemas produzidos não causam morte às células MN do sangue e, por conseguinte, não apresentam indícios de efeitos citotóxicos.

Os resultados obtidos por meio dos testes citotóxicos confirmam a biocompatibilidade das formulações produzidas, as quais favorecem a aplicação do IFN- γ sem agredir o meio biológico, com chances de melhorar a eficiência terapêutica, facilitar a administração e possibilitar uma vetorização do mesmo ao sistema imunológico.

A imunomodulação é um procedimento que interfere nas funções do organismo, pois altera o sistema imunológico que pode ser estimulado ou suprimido (MAKARE; BODHANKAR; RANGARI, 2001). A atuação de interferons na terapia imunológica depende da capacidade de se atingir os alvos específicos em dose e local adequados (DUNN; KOEBEL; SCHREIBER, 2006). Investigações importantes têm sido conduzidas visando a aplicação de sistemas de veiculação de interferons, com diferentes substâncias orgânicas, para modular células MN potencializando a fagocitose e a atividade microbicida (FAGUNDES et al., 2012; HARA et al., 2013; POSSAMAI et al., 2013; REINAQUE et al., 2012; SCHERER et al., 2011), inclusive com a utilização de sistemas nanoestruturados (PESSOA et al., 2014; RIBEIRO et al., 2015). Neste estudo observou-se que nanodoses de

IFN- γ incorporados em nanoemulsões e micelas nanoestruturadas apresentam efeitos moduladores diretamente sobre as funções e atividades dos fagócitos MN do sangue humano. Resultados semelhantes referentes à influência de citocinas na atividade funcional de fagócitos em bactérias (FAGUNDES et al., 2013) e protozoários (MORAES et al., 2015) foram relatados, em acordo com os resultados aqui registrados.

A liberação de ânion, fagocitose e atividade microbicida, associados com a resposta intracelular de Ca^{2+} , seja por fagócitos do colostro humano ou do sangue têm sido considerados como importante indicadores do mecanismo de defesa para várias infecções bacterianas (FRANÇA et al., 2010; MORCELLI et al., 2011) fúngicas (KUHLWEIN; IRWIN, 2001), e por protozoários (FRANCA-BOTELHO et al., 2011). Quando os fagócitos MN foram tratados com as formulações 1NEPIFN- γ e 11NEBIFN- γ , a liberação de ânion foi significativamente superior à espontânea e independente do tempo de incubação. Adicionalmente, apesar do IFN- γ ser um mediador da estimulação da síntese de intermediários reativos de oxigênio e de óxido nítrico (FARRAR; SCHREIBER, 1993), quando ele foi incubado na concentração em estudo isoladamente, não promoveu a estimulação, apenas quando foi veiculado por meio das formulações nanoemulsionadas.

A geração de radicais livres é um importante mecanismo de defesa do organismo durante processos infecciosos, sobretudo em infecções intestinais (FRANÇA et al., 2011b; FRANÇA-BOTELHO et al., 2011; HONORIO-FRANÇA et al., 1997). As células são capazes de produzir grandes quantidades de radicais superóxido durante um estresse oxidativo, mas o mesmo pode ser consideravelmente estimulado por compostos endógenos ou exógenos

(NASCIMENTO et al., 2006; ROBERTSON, 2004), como a melatonina (HONORIO-FRANÇA et al., 2013a; PAWLAK et al., 2005) e extratos vegetais (FRANÇA et al., 2010, 2012), respectivamente. Neste estudo, comparando-se o mesmo tratamento com as formulações desenvolvidas em função do tempo (de 0 a 2h), os monócitos sanguíneos apresentaram eficiência fagocítica superior aos controles (PBS, 1NEP e 11NEB) apenas depois de 30 mim de incubação, sendo que o IFN- γ teve atividade superior ao grupo espontâneo no início e aos 30 mim. Os sistemas 1NEPIFN- γ e 11NEBIFN- γ apresentaram estimulação em todo o período do estudo, assim como F127-50IFN- γ , com exceção para 60 mim. As nanoestruturas prologaram em 1,5 h o tempo de atuação do estímulo promovido pelo IFN- γ nas células fagocíticas, quando se compara ao resultado da mesma dose de IFN- γ puro. Estes resultados podem decorrer da interação do sistema desenvolvido com as células. A interação nanosistemas e células sanguíneas é um aspecto importante, pois o processo de internalização depende da concentração da nanoestrutura e do diâmetro hidrodinâmico (SANTANA et al., 2005; SOLER et al., 2007). Estas características podem estar diretamente relacionadas com a estimulação da fagocitose.

A melhora do desempenho de moléculas ativas em sistemas nanoestruturados de veiculação podem ser relacionadas à melhoria dos parâmetro farmacocinéticos, estabilidade metabólica, a alta permeabilidade nas membranas (ONOUÉ; YAMADA; CHAN, 2014) e também, conforme foi observado para as formulações desenvolvidas, o aumento do tempo de atuação. Adicionalmente, verificou-se que todas as nanoestruturas desenvolvidas para veiculação do IFN- γ estimularam a fagocitose, em algum tempo de incubação,

com destaque para 1NEPIFN- γ que foi efetiva nos tempos de 30, 60 e 120 mim. Os nanosistemas aqui desenvolvidos mostraram resultados de destaque quanto ao tempo e ao potencial de estimulação dos fagócitos, quando comparados com experimentos relativos à estimulação da atividade funcional dos leucócitos e bactérias (FRANÇA et al., 2009, 2011b; FRANCA-BOTELHO et al., 2011; HONORIO-FRANÇA et al., 2013a; RASSIAS et al., 1999).

Células mononucleares desempenham um papel importante na defesa do hospedeiro. Os monócitos no tecido conjuntivo ou parênquima de órgãos dão origem a macrófagos e células dendríticas mieloides. Os monócitos e macrófagos são fagócitos eficientes, engolfando patógenos e debris celulares (CRUVINEL et al., 2010; DALE; BOXER; LILES, 2008). Elas produzem NADPH oxidase fagocítica, que forma o superóxido ativo para fagocitar bactérias e é indispensável para o sucesso das respostas imunes e reações inflamatórias (DIZDAROGLU et al., 2002). Neste estudo, onde as células e as formulações estavam em solução e não dispostas em monocamadas celulares, nestas condições e tempos de incubação, a atividade fagocítica está relacionada possivelmente à atividade dos monócitos por não haver estímulos suficientes para sua diferenciação em macrófagos. Alguns estudos com base em sistemas nanoestruturados destinados a estimular a atividade fagocítica e microbicida são encontrados na literatura, mas nenhum para veiculação de interferon (FAGUNDES et al., 2012; HARA et al., 2013; POSSAMAI et al., 2013; REINAQUE et al., 2012; SCHERER et al., 2011). Por exemplo, nanosistemas contendo hormônios como o cortisol (FAGUNDES et al., 2012; RASSIAS et al., 1999), e a melatonina (FRANÇA et al., 2009; FRANÇA-BOTELHO et al., 2011; HARA et al., 2013), nano frações de *Momordica charantia* (SCHERER et al., 2011), e própolis (POSSAMAI et al., 2013), apresentaram

propriedades capazes de estimular a fagocitose. As formulações desenvolvidas neste estudo foram capazes de ativar a atividade fagocítica, porém este aumento não se refletiu sobre os mecanismos microbicidas celulares. Apesar das nanoestruturas estimularem a fagocitose, provavelmente a interação entre os componentes dos sistemas pode ter desencadeado outros mecanismos de eliminação da bactéria em relação aos mecanismos microbicidas intracelulares. Estes resultados confirmam dados da literatura que relatam que fagócitos do sangue de cordão umbilical expostos a EPEC e estimuladas por IFN- γ também mostram um aumento na fagocitose, mas não da atividade microbicida (FAGUNDES et al., 2013). Estudos indicam que estas células apresentam baixa atividade microbicida porque elas não possuem receptores de superfície específicos (FRANÇA; HONORIO-FRANÇA, 2012).

A estimulação imunológica, não diretamente ligada à atuação microbicida, tem sido o foco de diversos estudos e a literatura tem revelado que o IFN- γ desempenha um papel crítico e fisiologicamente relevante na promoção dos mecanismos de resistência do hospedeiro a infecções microbianas (IKEDA; OLD; SCHREIBER, 2002). Os processos de imunização também têm sido foco deste tipo de estudo e lipossomas contendo IFN- γ têm se mostrado eficazes (VAN SLOOTEN et al., 2001a). Adicionalmente, o papel do IFN- γ na proteção contra o desenvolvimento de células tumorais, no processo dinâmico de vigilância imune e na progressão tumoral tem sido relatado, mas ainda não esclarecido (SCHRODER et al., 2004). Neste estudo, em experimentos *in vitro*, as formulações 1NEPIFN- γ e 11NEBIFN- γ mostraram atividade antitumoral contra células MCF-7 de câncer da mama humano e em co-cultura com fagócitos MN,

respectivamente, conforme foi observado por meio das reduções na viabilidade celular e na liberação de cálcio intracelular.

Neste projeto, o ensaio de fluorescência de PI (DENGLER et al., 1995) foi empregado para investigar a capacidade do IFN- γ de diminuir o crescimento dos fagócitos MN, das células MCF-7 e da co-cultura formada por ambas. Esta inibição do crescimento celular foi mais evidente quando as células foram tratadas com IFN- γ puro em solução para todos os grupos celulares. Estes resultados estão de acordo com a literatura quando foi estudada a ação de IFN- γ em células tumorais (MILLER; MAHER; YOUNG, 2009) e, ao encontrarmos indícios de redução da viabilidade dos fagócitos MN, confirmando a hipótese de que o emprego desta citocina deve ser modulada de forma a não prejudicar a ação do sistema imunológico (ZAIDI; MERLINO, 2011). Este comportamento foi confirmado com os dados que indicam que as formulações 1NEPIFN- γ e 11NEBIFN- γ foram capazes de veicular de forma eficiente o IFN- γ , mantendo as propriedades antitumorais e modulando sua ação nos fagócitos MN.

A literatura indica que quando os fármacos são administrados na forma de NEs, podem apresentar maior atividade e menor toxicidade em relação à forma de solução, visto que se acumulam principalmente nos tumores, onde o endotélio dos capilares é fenestrado, permitindo a passagem de gotículas de até 400 nm (BRUXEL et al., 2012). Além disso, os relatos indicam que o desenvolvimento de uma NE não é apenas um meio adequado de solubilizar uma molécula, mas sim um fator essencial para a obtenção dos efeitos clínicos desejados. Para a maior parte dos fármacos, a estratégia utilizada visa a redução dos efeitos adversos, mantendo um efeito farmacológico alto ou superior, possibilitando a utilização de

menores doses e melhorando a farmacocinética da molécula (DUTTA; EBLING, 1997).

Para a formulação F127-50IFN- γ não se observou a capacidade de diminuir o crescimento celular em nenhum dos grupos por meio do ensaio de fluorescência de PI. Apesar disso, este sistema foi capaz de aumentar a liberação do cálcio intracelular nas células MCF-7 e na co-cultura, fato este que pode estar relacionado a um gatilho apoptótico posterior (ORRENIUS; ZHIVOTOVSKY; NICOTERA, 2003), o que indica a necessidade de um ensaio específico para estes grupos celulares.

O íon cálcio é um segundo mensageiro que tem papel fundamental na regulação de vários processos biológicos. Um aumento na concentração de Ca^{2+} citoplasmático representa um passo crucial para a liberação de neurotransmissores e para a modulação da excitabilidade de membranas celulares (PRADO, 2001). Neste estudo, a ativação dos fagócitos MN foi evidenciada pela atuação dos estímulos na liberação do cálcio. As formulações 1NEPIFN- γ , 11NEBIFN- γ e F127-50IFN- γ apresentaram efeitos diretos sobre os fagócitos do sangue, sendo capazes de aumentar significativamente a liberação de cálcio intracelular. Conseqüentemente, pode-se verificar que os mecanismos celulares foram ativados pelos estímulos nanoestruturados aqui desenvolvidos. Contudo, é importante ressaltar, que embora o Ca^{2+} seja fundamental à manutenção da vida, um aumento prolongado na concentração deste íon pode levar a célula à morte (LEE et al., 2000). O controle da sua liberação é relevante visto que o cálcio intracelular interfere diretamente nos processos celulares incluindo a proliferação, diferenciação e morte celular (FERRARI et al., 2002).

A imunomodulação como um todo, e não apenas na liberação de cálcio, deve ser controlada e eficiente para promover a erradicação da patologia sem causar dano ao hospedeiro (MANDAL et al., 2010; SAJAN et al., 2009), portanto, a utilização de sistemas de liberação nanoestruturados, como os aqui desenvolvidos, é efetiva e viável para a veiculação e estimulação promovida pelo IFN- γ .

CAPÍTULO 11

11 CONCLUSÕES

Os resultados obtidos mostraram a viabilidade de síntese de sistemas nanoestruturados para liberação de interferon gamma (IFN- γ) com o objetivo de sua utilização como agente imunomodulador. Foram desenvolvidas três formulações, sendo duas delas na forma de nanoemulsões, a partir dos sistemas SP/TW/P ou SP/TW/B) e a terceira com base no copolímero Pluronic F127.

As investigações que levaram à otimização das formulações foram baseadas nos diagramas pseudoternários, caracterização reológica e por espalhamento de luz dinâmica, estudo de estabilidade preliminar e acelerada. Em adição, foram realizados ensaios biológicos como a avaliação de viabilidade celular, liberação de ânion superóxido, fagocitose, atividade microbicida, avaliação da permeabilidade celular ao iodeto de propídio e de liberação de cálcio intracelular. Os resultados obtidos podem ser resumidos em:

- A proporção dos componentes dos sistemas SP/TW/P e SP/TW/B igual a 3,5:5,5:1,0 foi obtida considerando-se o EHL requerido pela fase oleosa e produziu diagramas para cada tipo com grande número de sistema nanoemulsionados (9 SP/TW/P e 13 SP/TW/B) de um total de 72 preparados;
- Os resultados obtidos a partir da caracterização reológica indicaram que das 9 nanoemulsões pré-selecionadas para o sistema NEP, 3 apresentaram fluxo Newtoniano e viscosidade linear, mesmo no caso das formulações correspondentes com a incorporação de IFN- γ , sendo selecionadas apenas 2;

- Enquanto que, dos 13 pontos pré-selecionados para o sistema NEB, 8 apresentaram fluxo Newtoniano e viscosidade linear, bem como para as formulações correspondentes, após a incorporação do IFN- γ , sendo selecionadas apenas 2;
- No caso das dispersões e formulações micelares, as amostras F127 a 10 e 50 mg.mL⁻¹ apresentaram fluxo Não-Newtoniano, pseudoplástico com tixotropia e viscosidade não linear;
- A dispersão F127 a 250 mg.mL⁻¹ comporta-se como um sólido elástico à temperatura de 25°C, com mudança de estado físico a 19°C, apresentando características líquidas viscosas abaixo desta temperatura, o mesmo ocorre para as formulações com a incorporação do IFN- γ ;
- As formulações nanoemulsionadas selecionadas 1NEPIFN- γ , 3NEPIFN- γ , 10NEBIFN- γ e 11NEBIFN- γ apresentaram potencial ζ em torno de - 40 mV e tamanho hidrodinâmico igual a 205, 183, 97 e 76 nm respectivamente.
- Enquanto as formulações F127-10IFN- γ e F127-50IFN- γ apresentaram potencial ζ neutro e D_H de 26 e 5 nm, respectivamente.
- Das formulações avaliadas, 1NEPIFN- γ , 3NEPIFN- γ , 10NEBIFN- γ , 11NEBIFN- γ , F127-10IFN- γ e F127-50IFN- γ foram aprovados nos testes de estabilidade preliminar;
- As formulações 1NEPIFN- γ , 11NEBIFN- γ e F127-50IFN- γ apresentaram estabilidade em condições extremas durante 90 dias, apresentando pH

biocompatível, perfil reológico, D_H , potencial ζ e dosagem de IFN- γ sem alterações;

- As formulações 1NEPIFN- γ , 11NEBIFN- γ e F127-50IFN- γ mantiveram os índices de viabilidade celular elevados comparados com o grupo controle (PBS);
- As nanoemulsões 1NEP, 11NEB, e as formulações 1NEPIFN- γ e 11NEBIFN- γ estimularam significativamente a liberação de ânion superóxido;
- As formulações 1NEPIFN- γ , 11NEBIFN- γ e F127-50IFN- γ estimularam significativamente a fagocitose;
- As formulações 1NEPIFN- γ , 11NEBIFN- γ e F127-50IFN- γ não estimularam diretamente a atividade microbicida;
- O IFN- γ em solução promoveu a morte dos fagócitos MN, de células MCF-7 de câncer de mama humano e da co-cultura destes;
- A nanoemulsão 11NEBIFN- γ induziu a morte das células MCF-7 de câncer de mama humano;
- A nanoemulsão 1NEPIFN- γ promoveu a morte de células MCF-7 de câncer de mama humano quando em co-cultura com os fagócitos MN;
- As formulações 1NEPIFN- γ , 11NEBIFN- γ e F127-50IFN- γ estimularam a liberação de cálcio intracelular nos fagócitos MN;
- A formulação F127-50IFN- γ estimulou a liberação de cálcio intracelular nas células MCF-7 de câncer de mama humano;

Em resumo, as nanoemulsões estáveis do tipo óleo-em-água, 1NEPIFN- γ e 11NEBIFN- γ contendo nano doses de IFN- γ foram preparadas por ultrahomogeneização empregando água destilada, triglicerídeo de ácido cáprico/caprílico, oleato de sorbitano (SP), polissorbato 80 (TW) e propilenoglicol (PG) ou 1-butanol (BT). Estas formulações, 1NEPIFN- γ e 11NEBIFN- γ , apresentam fluxo Newtoniano, viscosidade linear, potencial ζ em torno de - 40 mV e tamanho hidrodinâmico de 205 e 76 nm, respectivamente. A dispersão formada por micelas do copolímero Pluronic F127 (F127-50IFN- γ) em solução tampão fosfato (pH 7.4) na concentração de 50 mg.mL⁻¹ contendo nano doses de IFN- γ , se mostrou-se estável durante o período em estudo. A formulação F127-50IFN- γ apresenta fluxo não-Newtoniano, pseudoplástico com tixotropia, viscosidade não linear, potencial ζ neutro e tamanho hidrodinâmico de 4,5 nm. Em condições extremas durante 90 dias as formulações 1NEPIFN- γ , 11NEBIFN- γ e F127-50IFN- γ apresentam pH biocompatível, enquanto o perfil reológico, D_H, potencial ζ e a dosagem de IFN- γ permanecem sem alterações. Os resultados obtidos com o IFN- γ veiculado nas formulações desenvolvidas mostraram a possibilidade de otimizar a atividade imunomoduladora em infecções intestinais, indicada pelo aumento da liberação de ânion superóxido, da fagocitose e da liberação de Ca²⁺ intracelular em fagócitos do sangue humano quando se compara aos controles. Com relação às células cancerígenas, o efeito foi observado por meio da redução do crescimento das células MCF-7 e associados aos mecanismos desencadeados pelo Ca²⁺ neste grupo celular e nos fagócitos MN. Estes resultados indicam que as formulações sintetizadas são promissoras para a

modulação do sistema imunológico mediado por células, abrindo novas perspectivas para melhorar a eficiência de terapias à base de IFN- γ .

Finalmente, como perspectiva de trabalhos futuros, sugere-se investigar as formulações 1NEPIFN- γ , 11NEBIFN- γ e F127-50IFN- γ por meio de outras vias/testes específicos de modulação celular, como por exemplo, a apoptose dos fagócitos MN e das células MFC-7, além de testar as nanoestruturas desenvolvidas em outras linhagens de células cancerígenas. Em adição, o potencial termoresponsivo da formulação F127-250IFN- γ poderia ser explorado em outras aplicações biológicas.

REFERÊNCIAS

ABOOFAZELI, R.; PATEL, N.; THOMAS, M.; LAWRENCE, M. J. Investigations into the formation and characterization of phospholipid microemulsions. IV. Pseudo-ternary phase diagrams of systems containing water-lecithin-alcohol and oil; the influence of oil. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 125, p. 107–116, 1995.

ACHARYA, D. P.; HARTLEY, P. G. Progress in microemulsion characterization. **Current Opinion in Colloid & Interface Science**, v. 17, n. 5, p. 274–280, 2012.

AGARWAL, A.; VILENSKY, R.; STOCKDALE, A.; TALMON, Y.; UNFER, R. C.; MALLAPRAGADA, S. K. Colloidally stable novel copolymeric system for gene delivery in complete growth media. **Journal of controlled release**, v. 121, p. 28–37, 2007.

AGIMELEN, O. S.; HAMILTON, P.; HALEY, I.; NORDON, A.; VASILE, M.; SEFCIK, J.; MULHOLLAND, A. J. Estimation of particle size distribution and aspect ratio of non-spherical particles from chord length distribution. **Chemical Engineering Science**, v. 123, p. 629–640, 2015.

AJAZUDDIN; SARAF, S. Applications of novel drug delivery system for herbal formulations. **Fitoterapia**, v. 81, n. 7, p. 680–9, 2010.

AKASH, M. S. H.; REHMAN, K.; LI, N.; GAO, J. Q.; SUN, H.; CHEN, S. Sustained delivery of IL-1Ra from pluronic F127-based thermosensitive gel prolongs its therapeutic potentials. **Pharmaceutical Research**, v. 29, p. 3475–3485, 2012.

ANSARI, S. A. Skin pH and Skin Flora. In: HEALTHCARE, I. (Ed.). **Handbook of cosmetic science and technology**. 3. ed. [s.l: s.n.]p. 221–232.

ANSEL, H. C.; POPOVICH, N. G.; ALLEN JR, L. V. **Formas farmacêuticas e sistemas de liberação de fármacos**. 8. ed. São Paulo: Premier, 2007.

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

BABOOTA, S.; SHAKEEL, F.; AHUJA, A.; ALI, J.; SHAFIQ, S. Design, development and evaluation of novel nanoemulsion formulations for transdermal potential of celecoxib. **Acta pharmaceutica**, v. 57, n. 3, p. 315–332, 2007.

BAM, N. B.; RANDOLPH, T.; CLELAND, J. Stability of protein formulations : investigation of surfactant effects by a novel EPR spectroscopic technique. **Pharmaceutical Research**, v. 12, p. 2–11, 1995.

BARRATT, G. Therapeutic applications of colloidal drug carriers. **Pharmaceutical science & technology today**, v. 3, n. 5, p. 163–171, 2000.

BASAK, R.; BANDYOPADHYAY, R. Encapsulation of hydrophobic drugs in pluronic F127 micelles: Effects of drug hydrophobicity, solution temperature, and pH. **Langmuir**, v. 29, p. 4350–4356, 2013.

BAWARSKI, W. E.; CHIDLOWSKY, E.; BHARALI, D. J.; MOUSA, S. A. Emerging nanopharmaceuticals. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine**, v. 4, n. 4, p. 273–282, 2008.

BENITA, S.; LEVY, M. Y. Submicron Emulsions as Colloidal Drug Carriers for Intravenous Administration : Comprehensive Physicochemical Characterization. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 82, n. 11, p. 1069–1079, 1993.

BERNARDI, D. S.; PEREIRA, T. a; MACIEL, N. R.; BORTOLOTO, J.; VIERA, G. S.; OLIVEIRA, G. C.; ROCHA-FILHO, P. a. Formation and stability of oil-in-water nanoemulsions containing rice bran oil: in vitro and in vivo assessments. **Journal of Nanobiotechnology**, v. 9, n. 1, p. 2–9, 2011.

BERTHO, a L.; SANTIAGO, M. a; COUTINHO, S. G. Flow cytometry in the study of cell death. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 95, n. 3, p. 429–33, 2000.

BILLIAU, A.; MATTHYS, P. Interferon- γ : A historical perspective. **Cytokine and Growth Factor Reviews**, v. 20, n. 2, p. 97–113, 2009.

BOHORQUEZ, M.; KOCH, C.; TRYGSTAD, T.; PANDIT, N. A Study of the Temperature-Dependent Micellization of Pluronic F127. **Journal of colloid and interface science**, v. 40, p. 34–40, 1999.

BONIFACIO, B. V.; SILVA, P. B. da; RAMOS, M. A. dos S.; NEGRI, K. M. S.; CHORILLI, M. Nanotechnology-based drug delivery systems and herbal medicines : a review. **International Journal of Nanomedicine**, v. 9, p. 1–15, 2014.

BORHADE, V.; PATHAK, S.; SHARMA, S.; PATRAVALE, V. Clotrimazole nanoemulsion for malaria chemotherapy. Part I: Preformulation studies, formulation design and physicochemical evaluation. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 431, n. 1-2, p. 138–148, 2012.

BRUXEL, F.; LAUX, M.; WILD, L. B.; FRAGA, M.; KOESTER, L. S.; TEIXEIRA, H. F. Nanoemulsões como sistemas de liberação parenteral de fármacos. **Química Nova**, v. 35, n. 4, p. 1827–1840, 2012.

CAPEK, I. Sterically and electrosterically stabilized emulsion polymerization . Kinetics and preparation. **Advances in colloid and interface science**, v. 99, p. 77–162, 2002.

CHIME, S. A.; KENECHUKWU, F. C.; ATTAMA, A. A. Nanoemulsions - Advances in Formulation , Characterization and Applications in Drug Delivery. In: INTECH (Ed.). **Application of Nanotechnology in Drug Delivery**. 1. ed. [s.l: s.n.]p. 77–126.

CHRISTIAN, D. A.; HUNTER, C. A. Particle-mediated delivery of cytokines for immunotherapy. **Immunotherapy**, v. 4, n. 4, p. 425–441, 2013.

CONSTANTINIDES, P. P.; YIV, S. H. Particle size determination of phase-inverted water-in-oil microemulsions under different dilution and storage conditions. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 115, n. 2, p. 225–234, mar. 1995.

COTRIM, A. C. de M.; HONORIO-FRANÇA, A. C.; FRANÇA, E. L. Rheology analysis can be added in thermal stability test for design microemulsion materials. **Biointerface Research in Applied Chemistry**, v. 6, n. 2, p. 1128–1136, 2016.

CRUVINEL, W. D. M.; JÚNIOR, D. M.; ANTÔNIO, J.; ARAÚJO, P.; TIEKO, T.; CATELAN, T. Sistema Imunitário – Parte I Fundamentos da imunidade inata com ênfase nos mecanismos moleculares e celulares da resposta inflamatória. **Revista Brasileira de Reumatologia**, v. 55, n. 11, p. 434–461, 2010.

DALE, D. C.; BOXER, L.; LILES, W. C. The phagocytes: neutrophils and monocytes. **Blood journal**, v. 112, n. 4, p. 935–946, 2008.

DE PAULA, L. B.; PRIMO, F. L.; JARDIM, D. R.; MORAIS, P. C.; TEDESCO, a. C. Development, characterization, and in vitro trials of chloroaluminum phthalocyanine-magnetic nanoemulsion to hyperthermia and photodynamic therapies on glioblastoma as a biological model. **Journal of Applied Physics**, v. 111, p. 10–13, 2012.

DENGLER, W. A.; SCHULTE, J.; BERGER, D. P.; MERTELSMANN, R.; FIEBIG, H. H. Development of a propidium iodide fluorescence assay for proliferation and cytotoxicity assays. **Anticancer Drugs**, v. 6, n. 4, p. 522–532, 1995.

DIZDAROGLU, M.; JARUGA, P.; MUSTAFA, B.; RODRIGUEZ, H. Free Radical-induced damage to DNA: Mechanism and measurement. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 32, n. 11, p. 1102–1115, 2002.

DONSÌ, F.; ANNUNZIATA, M.; VINCENSI, M.; FERRARI, G. Design of nanoemulsion-based delivery systems of natural antimicrobials: Effect of the emulsifier. **Journal of Biotechnology**, v. 159, n. 4, p. 342–350, 2012.

DUNN, G. P.; KOEBEL, C. M.; SCHREIBER, R. D. Interferons, immunity and cancer immunoediting. **Nature reviews. Immunology**, v. 6, p. 836–848, 2006.

DUTTA, S.; EBLING, W. Emulsion formulation reduces Propofol's dose requirements and enhances safety. **Anesthesiology**, v. 87, p. 1394–1405, 1997.

EHLERS, H.; HEINÄMÄKI, J.; YLIRUUSI, J. Particology Particle size and packing characterization by diffuse light transmission. **Particology**, v. 10, n. 5, p. 619–627, 2012.

ENGLAND, J. Stabilization and release effects of Pluronic F127 in protein drug delivery. **Journal of Undergraduate Sciences**, v. 5, n. 2, p. 17–24, 1999.

FAGUNDES, D. L. G.; FRANÇA, E. L.; HARA, C. de C. P.; HONORIO-FRANÇA, A. C. Immunomodulatory Effects of Poly (Ethylene Glycol) Microspheres Adsorbed with Cortisol on Activity of Colostrum Phagocytes. **International Journal of Pharmacology**, v. 8, n. 6, p. 510–518, 2012.

FAGUNDES, D. L. G.; FRANÇA, E. L.; MORCELI, G.; VIEIRA, M.; RUDGE, C.; MATTOS, I. De; CALDERON, P.; HONORIO-FRANÇA, A. C. The Role of Cytokines in the Functional Activity of Phagocytes in Blood and Colostrum of Diabetic Mothers. **Clinical and Developmental Immunology**, v. 2013, p. 1–8, 2013.

FANUN, M. Formulation and characterization of microemulsions based on mixed nonionic surfactants and peppermint oil. **Journal of Colloid And Interface Science**, v. 343, n. 2, p. 496–503, 2010.

FARAJI, A. H.; WIPF, P. Nanoparticles in cellular drug delivery. **Bioorganic & medicinal chemistry**, v. 17, n. 8, p. 2950–2962, 2009.

FARRAR, M. a; SCHREIBER, R. D. The molecular cell biology of interferon-gamma and its receptor. **Annual review of immunology**, v. 11, p. 571–611, 1993.

FERNANDES, C P.; ALMEIDA, F. B. de; SILVEIRA, A. N.; GONZALEZ, M. S.; MELLO, C. B.; FEDER, D.; APOLINÁRIO, R.; SANTOS, M. G.; CARVALHO, J. C. T.; TIETBOHL, L. A. C.; FALCÃO, D. Q. Development of an insecticidal nanoemulsion with *Manilkara subsericea* (Sapotaceae) extract. **Journal of nanobiotechnology**, v. 12, p. 1–9, 2014.

FERNANDEZ, P.; ANDRÉ, V.; RIEGER, J.; KÜHNLE, A. Nano-emulsion formation by emulsion phase inversion. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 251, p. 53–58, 2004.

FERRARI, D.; PINTON, P.; SZABADKAI, G.; CHAMI, M.; CAMPANELLA, M.; POZZAN, T.; RIZZUTO, R. Endoplasmic reticulum , Bcl-2 and Ca²⁺ handling in apoptosis. **Cell Calcium**, v. 32, p. 413–420, 2002.

FORMARIZ, T. P.; SARMENTO, V. H. V; SILVA-JUNIOR, a a; SCARPA, M. V; SANTILLI, C. V; OLIVEIRA, a G. Doxorubicin biocompatible O/W microemulsion stabilized by mixed surfactant containing soya phosphatidylcholine. **Colloids and surfaces. B, Biointerfaces**, v. 51, n. 1, p. 54–61, 2006.

FRANÇA, E. L.; BITENCOURT, R. V.; FUJIMORI, M.; MORAIS, T. C. de; CALDERON, I. de M. P.; HONORIO-FRANÇA, A. C. Human colostrum phagocytes eliminate enterotoxigenic *Escherichia coli* opsonized by colostrum supernatant. **Journal of Microbiology, Immunology and Infection**, v. 44, p. 1–7, 2011a.

FRANÇA, E. L.; FAGUNDES, D. L. G.; LEÃO, L. D.; HONORIO-FRANÇA, A. C. Efeito do composto “mais vida” na ativação de macrófagos de ratos diabéticos. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 14, n. 1, p. 1–7, 2012.

FRANÇA, E. L.; FELICIANO, N. D.; SILVA, K. A.; KUSANO, C.; FERRARI, B.; HONORIO-FRANÇA, A. C. Modulatory role of melatonin on superoxide release by spleen macrophages isolated from alloxan-induced diabetic rats. **Bratislava Medical Journal**, v. 110, n. 9, p. 517–522, 2009.

FRANÇA, E. L.; HONORIO-FRANÇA, A. C. The Mucosal Immune System : Modulation by Microemulsion. In: NAJJAR, R. (Ed.). **Microemulsions - An Introduction to Properties and Applications**. InTech ed. [s.l: s.n.]p. 151–158.

FRANÇA, E. L.; MAYNIÉ, J. C.; CORREA, V. C.; CORREIA, U.; PEREIRA, R.; BATALINI, C.; KUSANO, C.; FERRARI, B. Immunomodulatory effects of herbal plants plus melatonin on human blood phagocytes. **International Journal of Phytomedicine**, v. 2, p. 354–362, 2010.

FRANÇA, E. L.; MORCELI, G.; FAGUNDES, D. L. G.; RUDGE, M. V. C.; CALDERON, I. de M. P.; HONÓRIO-FRANÇA, A. C. Secretory IgA–Fc α receptor interaction modulating phagocytosis and microbicidal activity by phagocytes in human colostrum of diabetics. **Apmis**, v. 2, p. 710–719, 2011b.

FRANÇA-BOTELHO, A. C.; FRANÇA, J. L.; OLIVEIRA, F. M. S.; FRANCA, E. L.; HONÓRIO-FRANÇA, A. C.; CALIARI, M. V.; GOMES, M. a. Melatonin reduces the severity of experimental amoebiasis. **Parasites & vectors**, v. 4, n. 1, p. 62, 2011.

FRANCA-BOTELHO, A. C.; LOPES, R. P.; FRANCA., J. L.; GOMES, M. A. Advances in Amoebiasis Research Emphasizing Immunological and Oxidative Aspects. **Research Journal of Parasitology**, v. 6, n. 1, p. 1–17, 2011.

FRENSTER, J. H. Electron microscopic localization of acridine orange binding to DNA within various human brain tumor cells. **Cancer research**, v. 31, p. 1128–1133, 1971.

FRYD, M. M.; MASON, T. G. Advanced Nanoemulsions. **Annual Review of Physical Chemistry**, v. 63, p. 493–518, 2012.

GHOSH, V.; SARANYA, S.; MUKHERJEE, A.; CHANDRASEKARAN, N. Antibacterial microemulsion prevents sepsis and triggers healing of wound in wistar rats. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 105, p. 152–157, 2013.

GÓMEZ, S.; GAMAZO, C.; SAN, B.; GRAU, A.; ESPUELAS, S.; FERRER, M.; SANZ, M. L.; IRACHE, J. M. A novel nanoparticulate adjuvant for immunotherapy with *Lolium perenne*. **Journal of Immunological Methods**, v. 348, n. 1-2, p. 1–8, 2009.

GUAN, Y.; ZHENG, Z.; LI, Z.; LIU, J. Cell death in HeLa mediated by thermoplastic polyurethane with co-immobilized IFN-g plus TNF- α . **Acta Biomaterialia**, v. 8, n. 3, p. 1348–1356, 2012.

GUTIÉRREZ, J. M.; GONZÁLEZ, C.; MAESTRO, A.; SOLÈ, I.; PEY, C. M.; NOLLA, J. Nano-emulsions: New applications and optimization of their preparation. **Current Opinion in Colloid and Interface Science**, v. 13, p. 245–251, 2008.

HAMOUDA, T.; SUTCLIFFE, J. a.; CIOTTI, S.; BAKER, J. R. Intranasal immunization of ferrets with commercial trivalent influenza vaccines formulated in a nanoemulsion-based adjuvant. **Clinical and Vaccine Immunology**, v. 18, p. 1167–1175, 2011.

HARA, C. de C. P.; HONÓRIO-FRANÇA, A. C.; FAGUNDES, D. L. G.; GUIMARÃES, P. C. L.; FRANÇA, E. L. Melatonin Nanoparticles Adsorbed to Polyethylene Glycol Microspheres as Activators of Human Colostrum Macrophages. **Journal of Nanomaterials**, v. 2, p. 1–8, 2013.

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

HONORIO-FRANÇA, A. C.; CARVALHO, M. P. S. M.; ISAAC, L.; TRABULSI, L. R.; CARNEIRO-SAMPAIO, M. M. S. Colostral Mononuclear Phagocytes are Able to Kill Enteropathogenic Escherichia coli Opsonized with Colostral IgA. **Scandinavian Journal of Immunology**, v. 46, p. 59–66, 1997.

HONORIO-FRANÇA, A. C.; HARA, C. de C. P.; ORMONDE, J. V. S.; NUNES, G. T.; FRANÇA, E. L. Human colostrum melatonin exhibits a day-night variation and modulates the activity of colostrum phagocytes. **Journal of Applied Biomedicine**, v. 11, p. 153–162, 2013a.

HONORIO-FRANÇA, A. C.; LANES, P. K. D.; RIBEIRO, E. B.; FRANÇA, E. L. Chronopharmacology for Anthelmintic: Immune and Modified Release of Drugs Prospectus. **Science International**, v. 1, n. 2, p. 22–28, 2013b.

HONÓRIO-FRANÇA, A. C.; MORAIS, T. C. de; SILVA, R. R.; ROSA, J. C. S.; VENTURINI, L. G. R.; FRANÇA, E. L. Immunomodulation by cytokines in chronobiological vision. **World Journal of Pharmaceutical research**, v. 2, n. 5, p. 1325–1345, 2013.

HONÓRIO-FRANÇA, A. C.; NUNES, G. T.; FAGUNDES, D. L. G.; MARCHI, P. G. F. de; FERNANDES, R. T. da S.; FRANÇA, J. L.; FRANÇA-BOTELHO, A. do C.; MORAES, L. C. A.; VAROTTI, F. de P.; FRANÇA, E. L. Intracellular calcium is a target of modulation of apoptosis in MCF-7 cells in the presence of IgA adsorbed to polyethylene glycol. **OncoTargets and Therapy**, n. 9, p. 617–626, 2016.

HOUSAINDOKHT, M. R.; POUR, A. N. Study the effect of HLB of surfactant on particle size distribution of hematite nanoparticles prepared via the reverse microemulsion. **Solid State Sciences**, v. 14, n. 5, p. 622–625, 2012.

IKEDA, H.; OLD, L. J.; SCHREIBER, R. D. The roles of IFN in protection against tumor development and cancer immunoediting. **Cytokine and Growth Factor Reviews**, v. 13, n. 2, p. 95–109, 2002.

JEON, S.; GRANICK, S.; KWON, K.; CHAR, K. Microviscosity in Poly (ethylene oxide) -Polypropylene Oxide-Poly (ethylene oxide) Block Copolymers Probed by. **Journal of polymer science**, v. 40, p. 2883–2888, 2002.

JONES, D. S.; LUCIANO, M.; FREITAS, O. De; PALMIRA, M.; GREMIÃO, D.; HELENA, E.; LARA, G.; ANDREWS, G. P. Rheological , mechanical and mucoadhesive properties of thermoresponsive , bioadhesive binary mixtures composed of poloxamer 407 and carbopol 974P designed as platforms for implantable drug delivery systems for use in the oral cavity. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 372, p. 49–58, 2009.

KABRI, T.; ARAB-TEHRANY, E.; BELHAJ, N.; LINDER, M. Physico-chemical characterization of nano-emulsions in cosmetic matrix enriched on omega-3. **Journal of Nanobiotechnology**, v. 9, n. 1, p. 1–8, 2011.

KARAU, C.; OETSZULAT, M.; SHMIDT, P. C. Preparation and stability of interferon-a-containing liposomes. **International journal of pharmaceutics**, v. 128, p. 89–98, 1996.

KIM, M.-G.; PARK, J. Y.; SHON, Y.; KIM, G.; SHIM, G.; OH, Y.-K. Nanotechnology and vaccine development. **Asian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 9, n. 5, p. 227–235, 2014.

KREILGAARD, M. Influence of microemulsion on cutaneous drugs delivery. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 54, p. 77–98, 2002.

KREUTER, J. Nanoparticles and microparticles for drug and vaccine delivery. **Journal of anatomy**, v. 189, p. 503–5, 1996.

KUHLWEIN, E.; IRWIN, M. Melatonin modulation of lymphocyte proliferation and Th1 r Th2 cytokine expression. **Journal of Neuroimmunology**, v. 117, p. 51–57, 2001.

KUMARI, A.; YADAV, S. K.; YADAV, S. C. Biodegradable polymeric nanoparticles based drug delivery systems. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 75, p. 1–18, 2010.

LAWRENCE, M. J.; REES, G. D. Microemulsion-based media as novel drug delivery systems. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 64, p. 175–193, 2012.

LEE, Y. B.; DU, S.; RHIM, H.; LEE, E. B.; MARKELONIS, G. J.; OH, T. H. Rapid increase in immunoreactivity to GFAP in astrocytes in vitro induced by acidic pH is mediated by calcium influx and calpain I. **Brain Research**, v. 864, p. 220–229, 2000.

LI, X.; CHAI, J.; SHANG, S.; LI, H.; LU, J.; YANG, B.; WU, Y. Phase Behavior of Alcohol - Free Microemulsion Systems Containing Butyric Acid as a Cosurfactant. **Journal of Chemical & Engineering**, v. 55, p. 3221–3228, 2010.

MAHDI, E. S.; SAKEENA, M. H.; ABDULKARIM, M. F.; ABDULLAH, G. Z.; SATTAR, M. A.; NOOR, A. M. Effect of surfactant and surfactant blends on pseudoternary phase diagram behavior of newly synthesized palm kernel oil esters. **Drug Design, Development and Therapy**, v. 5, p. 311–323, 2011.

MAKARE, N.; BODHANKAR, S.; RANGARI, V. Immunomodulatory activity of alcoholic extract of *Mangifera indica* L. in mice. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 78, p. 133–137, 2001.

MANDAL, A. S.; BISWAS, N.; KARIM, K. M.; GUHA, A.; CHATTERJEE, S.; BEHERA, M.; KUOTSU, K. Drug delivery system based on chronobiology-A review. **Journal of controlled release**, v. 147, n. 3, p. 314–325, 2010.

MANIASSO, N. Ambientes micelares em química analítica. **Química nova**, v. 24, n. 1, p. 87–93, 2001.

MARTIN, A. N.; SINKO, P. J.; SINGH, Y. **Physical pharmacy and pharmaceutical sciences**. 6. ed. Philadelphia: Wolters Kluwer, 2011.

MARTINS, J. P.; MAGESTE, A. B.; SILVA, M. do C. H. da; SILVA, L. H. M. da; PATRÍCIO, P. da R.; COIMBRA, J. S. dos R.; MINIM, L. A. Liquid - Liquid Equilibria of an Aqueous Two - Phase System Formed by a Triblock Copolymer and Sodium Salts at Different Temperatures. **Journal of Chemical & Engineering**, v. 10, p. 2891–2894, 2009.

MASMOUDI, H.; DRÉAU, Y. Le; PICCERELLE, P.; KISTER, J. The evaluation of cosmetic and pharmaceutical emulsions aging process using classical techniques and a new method: FTIR. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 289, p. 117–131, 2005.

MASON, T. G.; WILKING, J. N.; MELESON, K.; CHANG, C. B.; GRAVES, S. M. Nanoemulsions: formation, structure, and physical properties. **Journal of Physics: Condensed Matter**, v. 18, p. R635–R666, 2006.

MCCLEMENTS, D. J. Nanoemulsions versus microemulsions: terminology, differences, and similarities. **Soft Matter**, v. 8, p. 1719, 2012.

MILLER, C. H. T.; MAHER, S. G.; YOUNG, H. A. Clinical Use of Interferon- γ . **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 79, p. 69–79, 2009.

MISHRA, B.; PATEL, B. B.; TIWARI, S. Colloidal nanocarriers: a review on formulation technology, types and applications toward targeted drug delivery. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine**, v. 6, n. 1, p. 9–24, 2010.

MORAES, L. C. A.; FRANÇA, E. L.; PESSOA, R. S.; FAGUNDES, D. L. G.; HERNANDES, M. G.; RIBEIRO, V. P.; GOMES, M. A.; HONORIO-FRANÇA, A. C. The effect of IFN- γ and TGF- β in the functional activity of mononuclear cells in the presence of *Entamoeba histolytica*. **Parasites & Vectors**, v. 8, n. 1, p. 413, 2015.

MORCELI, G.; FRANÇA, E. L.; MAGALHÃES, V. B.; DAMASCENO, D. C.; CALDERON, I. M. P.; HONORIO-FRANÇA, a C. Diabetes induced immunological and biochemical changes in human colostrum. **Acta paediatrica**, v. 100, n. 4, p. 550–6, abr. 2011.

NAMBAM, J. S.; PHILIP, J. Thermogelling properties of triblock copolymers in the presence of hydrophilic Fe₃O₄ nanoparticles and surfactants. **Langmuir**, v. 28, p. 12044–12053, 2012.

NASCIMENTO, R. F.; BARROQUEIRO, E. S. B.; PAULA, A.; AZEVEDO, S.; LOPES, A. S.; FERREIRA, S. C. P.; SILVA, L. A.; MACIEL, C. G.; RODRIGUEZ, D.; GUERRA, R. N. M. Macrophage activation induced by *Orbignya phalerata* Mart. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 103, n. 1, p. 53–58, 2006.

NEL, A.; XIA, T.; MÄDLER, L.; LI, N. Toxic potential of materials at the nanolevel. **Science**, v. 311, n. 006, p. 622–627, 2006.

ONOUÉ, S.; YAMADA, S.; CHAN, H. K. Nanodrugs: Pharmacokinetics and safety. **International Journal of Nanomedicine**, v. 9, p. 1025–1037, 2014.

ORRENIUS, S.; ZHIVOTOVSKY, B.; NICOTERA, P. Regulation of cell death: The calcium–Apoptosis link. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 4, n. 7, p. 552–565, 2003.

OSTERHOLD, M. Rheological methods for characterising modern paint systems. **Progress in Organic Coating**, v. 40, p. 131–137, 2000.

PAWLAK, J.; SINGH, J.; LEA, R. W.; SKWARLO-SONTA, K. Effect of melatonin on phagocytic activity and intracellular free calcium concentration in testicular macrophages from normal and streptozotocin-induced diabetic rats. **Molecular and cellular biochemistry**, v. 275, n. 1-2, p. 207–13, 2005.

PEC, E. A.; WOUT, Z. G.; JOHNSTON, T. P. Biological Activity of Urease Formulated in Poloxamer 407 after Intraperitoneal Injection in the Rat. **Journal of pharmaceutical sciences**, v. 81, p. 626–630, 1992.

PENG, L. C.; LIU, C. H.; KWAN, C. C.; HUANG, K. F. Optimization of water-in-oil nanoemulsions by mixed surfactants. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 370, n. 1-3, p. 136–142, 2010.

PERCORA, R. **Dynamic light scattering: applications of photon correlation spectroscopy**. 1. ed. [s.l.: s.n.]

PESSOA, R. S.; FRANÇA, E. L.; RIBEIRO, E. B.; ABUD, N. G.; HONORIO-, A. C. Microemulsion of babassu oil as a natural product to improve human immune system function. **Drug Design, Development and Therapy**, v. 9, p. 21–31, 2014.

PESTANA, K. C.; FORMARIZ, T. P.; FRANZINI, C. M.; SARMENTO, V. H. V.; CHIAVACCI, L. a; SCARPA, M. V; EGITO, E. S. T.; OLIVEIRA, a G. Oil-in-water lecithin-based microemulsions as a potential delivery system for amphotericin B. **Colloids and surfaces. B, Biointerfaces**, v. 66, n. 2, p. 253–9, 2008.

PODLOGAR, F.; GASPERLIN, M.; TOMSIC, M.; JAMNIK, A.; ROGAC, M. B. Structural characterisation of water-Tween 40/Imwitor 308-isopropyl myristate microemulsions using different experimental methods. **International journal of pharmaceutics**, v. 276, n. 1-2, p. 115–28, 2004.

POSSAMAI, M. M.; HONORIO-FRANÇA, A. C.; REINAQUE, A. P. B.; FRANÇA, E. L.; SOUTO, P. C. de S. Brazilian Propolis: A Natural Product that Improved the Fungicidal Activity by Blood Phagocytes. **Journal of Biomedicine and Biotechnology**, v. 2013, p. 1–9, 2013.

PRADO, W. a. Involvement of calcium in pain and antinociception. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 34, p. 449–461, 2001.

PRATAP, S. B.; BRAJESH, K.; JAIN, S. K.; KAUSAR, S. Development and Characterization of A Nanoemulsion Gel formulation for Transdermal delivery of Carvedilol. **International Journal of Drug Development Research**, v. 4, n. 1, p. 151–161, 2012.

PRIDGEN, E. M.; ALEXIS, F.; KUO, T. T.; LEVY-NISSENBAUM, E.; KARNIK, R.; BLUMBERG, R. S.; LANGER, R.; FAROKHZAD, O. C. Transepithelial transport of Fc-targeted nanoparticles by the neonatal fc receptor for oral delivery. **Science translational medicine**, v. 5, p. 1–8, 2013.

PY-DANIEL, K. R.; NAMBAN, J. S.; ANDRADE, L. R. De; SOUZA, P. E. N. De; PATERNO, L. G.; AZEVEDO, R. B.; SOLER, M. A. G. Highly efficient photodynamic therapy colloidal system based on chloroaluminum phthalocyanine / pluronic micelles. **European journal of pharmaceutical and biopharmaceutics**, v. 103, p. 23–31, 2016.

RASSIAS, A. J.; MARRIN, C. A. S.; ARRUDA, J.; WHALEN, P. K.; BEACH, M.; YEAGER, M. P. Insulin Infusion Improves Neutrophil Function in Diabetic Cardiac Surgery Patients. **Anesthesia & Analgesia**, v. 88, p. 1011–1016, 1999.

REINAQUE, A. P. B.; FRANÇA, E. L.; SCHERER, E. F.; CÔRTEZ, M. A.; SOUTO, F. J. D.; HONORIO-FRANÇA, A. C. Natural material adsorbed onto a polymer to enhance immune function. **Drug Design, Development and Therapy**, v. 6, p. 209–216, 2012.

RIBEIRO, E. B.; KELLY, P.; LANES, D.; GALDEANO, N.; CHAUD, A.; PESSOA, R. S.; HONORIO-FRANÇA, A. C.; FRANÇA, E. L. Microemulsions with Levamisole Delivery Systems as Novel Immunomodulating Agents with Potential for Amebiasis Therapies. **Science of Advanced Materials**, v. 7, p. 15–27, 2015.

RIET, V. E.; HARTGERS, F. C.; YAZDANBAKHSH, M. Chronic helminth infections induce immunomodulation: consequences and mechanisms. **Immunobiology**, v. 212, n. 6, p. 475–90, 2007.

ROBERTSON, R. P. Chronic oxidative stress as a central mechanism for glucose toxicity in pancreatic islet beta cells in diabetes. **The Journal of biological chemistry**, v. 279, n. 41, p. 42351–42354, 2004.

ROJAS, O.; KOETZ, J.; KOSMELLA, S.; TIERSCH, B.; WACKER, P.; KRAMER, M. Structural studies of ionic liquid-modified microemulsions. **Journal of colloid and interface science**, v. 333, n. 2, p. 782–90, 2009.

ROLAND, I.; PIEL, G.; DELATTRE, L.; EVRARD, B. Systematic characterization of oil-in-water emulsions for formulation design. **International Journal of Pharmaceuticals**, v. 263, p. 85–94, 2003.

ROSEN, M. J. **Surfactants and interfacial phenomena surfactants and interfacial phenomena**. 3ed. ed. [s.l: s.n.]

SAJAN, J.; CINU, T. A.; CHACKO, A. J.; LITTY, J.; JASEEDA, T. Chronotherapeutics and Chronotherapeutic Drug Delivery Systems. **Tropical Journal of Pharmaceutical Research**, v. 8, n. 5, p. 467–475, 2009.

SANCHEZ, A.; TOBIO, M.; GONZALES, L.; FABRA, A.; ALONSO, M. J. B iodegradable micro- and nanoparticles as long-term delivery vehicles for. **European journal of pharmaceutical sciences**, v. 18, p. 221–229, 2003.

SANCHEZ-MUÑOZ, F. Role of cytokines in inflammatory bowel disease. **World Journal of Gastroenterology**, v. 14, n. 27, p. 4280, 2008.

SANTANA, J. F. B.; SOLER, M. a. G.; DA SILVA, S. W.; GUEDES, M. H.; LACAVA, Z. G. M.; AZEVEDO, R. B.; MORAIS, P. C. Investigation of the interaction between magnetic nanoparticles surface-coated with carboxymethyl dextran and blood cells using Raman spectroscopy. **Journal of Magnetism and Magnetic Materials**, v. 289, p. 452–454, 2005.

SARAF, S.; ALEXANDER, A.; AJAZUDDIN; KHAN, J.; SARAF, S. Poly(ethylene glycol)-poly(lactic-co-glycolic acid) based thermosensitive injectable hydrogels for biomedical applications. **Journal of Controlled Release**, v. 172, n. 3, p. 715–729, 2013.

SCHERER, E. F.; HONORIO-FRANÇA, A. C.; HARA, C. C. P. de; REINAQUE, A. P. B.; CÔRTEZ, M. A.; FRANÇA, E. L. Immunomodulatory Effects of Poly(ethylene glycol) Microspheres Adsorbed with Nanofractions of *Momordica charantia* L. on Diabetic Human Blood Phagocytes. **Science of Advanced Materials**, v. 3, n. 5, p. 687–694, out. 2011.

SCHRAMM, G. **A practical approach to rheology and rheometry**. 2nd. ed. [s.l.: s.n.]

SCHRODER, K.; HERTZOG, P. J.; RAVASI, T.; HUME, D. A. Interferon- γ : an overview of signals, mechanisms and functions. **Journal of leukocyte Biology**, v. 75, n. 2, p. 163–189, 2004.

SEGURA, S.; ESPUELAS, S.; MJ, R.; JM, I. Potential of albumin nanoparticles as carriers for interferon gamma. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, v. 31, p. 271–280, 2005.

SEGURA, S.; GAMAZO, C.; IRACHE, J. M.; ESPUELAS, S. Gamma interferon loaded onto albumin nanoparticles: In vitro and in vivo activities against *Brucella abortus*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 51, n. 4, p. 1310–1314, 2007.

SHAHRIVAR, K.; VICENTE, J. Thermogelling magnetorheological fluids. **Smart Materials and Structures**, v. 23, p. 1–9, 2014.

SHAKEEL, F.; BABOOTA, S.; AHUJA, A.; ALI, J.; AQIL, M.; SHAFIQ, S. Nanoemulsions as vehicles for transdermal delivery of aceclofenac. **AAPS PharmSciTech**, v. 8, n. 4, p. 1–9, 2007.

SHARMA, G.; WILSON, K.; WALLE, C. F. Van Der; SATTAR, N.; PETRIE, J. R.; KUMAR, M. N. V. R. Microemulsions for oral delivery of insulin: Design , development and evaluation in streptozotocin induced diabetic rats. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 76, n. 2, p. 159–169, 2010.

SHARMA, P. K.; REILLY, M. J.; BHATIA, S. K.; SAKHITAB, N.; ARCHAMBAULT, J. D.; BHATIA, S. R. Effect of pharmaceuticals on thermoreversible gelation of PEO – PPO – PEO copolymers. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 63, p. 229–235, 2008.

SILVA, T. L.; REIS, a; HEWITT, C.; ROSEIRO, J. C. Citometria de fluxo: funcionalidade celular on-line em bioprocessos. **Boletim de Biotecnologia**, v. 77, p. 32–40, 2004.

SIMARD, C.; CLOUTIER, M.; NÉRON, S. Rapid determination of il-6 specific activity by flow cytometry. **Journal of Immunological Methods**, v. 415, p. 63–65, 2014.

SLOOTEN, M. L. Van; HAYON, I.; BABAI, I.; ZAKAY-RONES, Z.; WAGNER, E.; STORM, G.; KEDAR, E. Immunoadjuvant activity of interferon-gamma-liposomes co-administered with influenza vaccines. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1531, p. 99–110, 2001.

SLOOTEN, M. L. Van; STORM, G.; ZOEPHEL, A.; KU, Z.; WAGNER, E.; KIRCHEIS, R. Liposomes Containing Interferon- Gamma as Adjuvant in Tumor Cell Vaccines. **Pharmaceutical research**, v. 17, n. 1, p. 42–48, 2000.

SMITH, C.; SIMPSON, C. A.; KIM, G.; CARTER, C. J.; FELDHEIM, D. L. Gastrointestinal Bioavailability of 2.0 nm Diameter Gold Nanoparticles. **Acsnano**, v. 7, n. 5, p. 3991–3996, 2013.

SMITH, D. L.; ROMMEL, F. A rapid micro method for the simultaneous determination of phagocytic - microbicidal activity of human peripheral blood leukocytes in vitro. **Journal Immunology Methods**, v. 17, p. 241–247, 1977.

SMITH, D. M.; SIMON, J. K.; BAKER, J. R. Applications of nanotechnology for immunology. **Nature reviews. Immunology**, v. 13, p. 592–605, 2013.

SOGA, O.; VAN NOSTRUM, C. F.; FENS, M.; RIJCKEN, C. J. F.; SCHIFFELERS, R. M.; STORM, G.; HENNINK, W. E. Thermosensitive and biodegradable polymeric micelles for paclitaxel delivery. **Journal of Controlled Release**, v. 103, p. 341–353, 2005.

SOLANS, C.; IZQUIERDO, P.; NOLLA, J.; AZEMAR, N.; GARCIA-CELMA, M. J. Nano-emulsions. **Current Opinion in Colloid and Interface Science**, v. 10, p. 102–110, 2005.

SOLER, M. a G.; BÁO, S. N.; ALCÂNTARA, G. B.; TIBÚRCIO, V. H. S.; PALUDO, G. R.; SANTANA, J. F. B.; GUEDES, M. H.; LIMA, E. C. D.; LACAVA, Z. G. M.; MORAIS, P. C. Interaction of erythrocytes with magnetic nanoparticles. **Journal of nanoscience and nanotechnology**, v. 7, n. 3, p. 1069–1071, 2007.

SOLER, M. A. G.; LIMA, E. C. D.; NUNES, E. S.; SILVA, F. L. R.; OLIVEIRA, A. C.; AZEVEDO, R. B.; MORAIS, P. C. Spectroscopic study of maghemite nanoparticles surface-grafted with DMSA. **Journal of Physical Chemistry A**, v. 115, n. 6, p. 1003–1008, 2011.

SOLER, M. A. G.; PATERNO, L. G. Nanomateriais magnéticos. In: ELSEVIER (Ed.). **Nanomateriais princípios e Aplicações**. [s.l: s.n.]1p. 173–221.

SONG, M. J.; LEE, D. S.; AHN, J. H.; KIM, D. J.; KIMI, S. C. Dielectric behavior during sol-gel transition of PEO-PPO-PEO triblock copolymer aqueous solution. **Polymer Bulletin**, v. 504, p. 497–504, 2000.

STANISÇUASKI, S. R.; GUTERRES, S. S.; FREITAS, L. de L.; POHLMANN, A. R. Caracterização e Estabilidade Físico-química de sistemas poliméricos nanoparticulados para administração de fármacos. **Química nova**, v. 26, n. 5, p. 726–737, 2003.

SUBRAMANIAN, N.; GHOSAL, S. K.; ACHARYA, A.; MOULIK, S. P. Formulation and physicochemical characterization of microemulsion system using isopropyl myristate, medium-chain glyceride, polysorbate 80 and water. **Chemical & pharmaceutical bulletin**, v. 53, n. 12, p. 1530–5, 2005.

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

TIDWELL, T. J.; PAULA, R. De; SMADI, M. Y.; KEASLER, V. V. Flow cytometry as a tool for oil field biocide efficacy testing and monitoring. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 98, p. 26–34, 2015.

TORCHILIN, V. P. Recent advances with liposomes as pharmaceutical carriers. **Nature reviews. Drug discovery**, v. 4, n. 2, p. 145–160, 2005.

TSAI, Y.-H.; LEE, K.-F.; HUANG, Y.-B.; HUANG, C.-T.; WU, P.-C. In vitro permeation and in vivo whitening effect of topical hesperetin microemulsion delivery system. **International journal of pharmaceutics**, v. 388, n. 1-2, p. 257–62, 2010.

VAN SLOOTEN, M. L.; BOERMAN, O.; ROMØREN, K.; KEDAR, E.; CROMMELIN, D. J.; STORM, G. Liposomes as sustained release system for human interferon-gamma: biopharmaceutical aspects. **Biochimica et biophysica acta**, v. 1530, p. 134–145, 2001a.

VAN SLOOTEN, M. L.; HAYON, I.; BABAI, I.; ZAKAY-RONES, Z.; WAGNER, E.; STORM, G.; KEDAR, E. Immunoadjuvant activity of interferon- G-liposomes co-administered with influenza vaccines. **Biochimica et biophysica acta**, v. 1531, p. 99–110, 2001b.

VAN SLOOTEN, M. L.; VISSER, a. J. W. G.; VAN HOEK, A.; STORM, G.; CROMMELIN, D. J. a; JISKOOT, W. Conformational stability of human interferon-gamma on association with and dissociation from liposomes. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 89, n. 12, p. 1605–1619, 2000.

VILLANOVA, J. C. O.; ORÉFICE, R. L.; CUNHA, A. S. Aplicações Farmacêuticas de Polímeros. **Polímeros**, v. 20, n. 1, p. 51–64, 2010.

WANG, L.; PENG, M.; ZHU, Y.; TONG, S.; CAO, X.; XU, X.; YU, J. Preparation of Pluronic / Bile salt / Phospholipid Mixed Micelles as Drug Solubility Enhancer and Study the Effect of the PPO Block Size on the Solubility of Pyrene. **Iranian Journal of Pharmaceutical Research**, v. 13, p. 1157–1163, 2014.

WASHINHGTON, C. **Particle size analysis in pharmaceuticals and other industries. theory and practice.** Chicherter, England: Ellis Horwood, 1992.

WILLIAMS, J. G.; JURKOVICH, G. J.; MAIER, R. V. Interferon-gamma: a key immunoregulatory lymphokine. **Journal of Surgical Research**, v. 54, p. 79–93, 1993.

WU, L.; ZHANG, J.; WATANABE, W. Physical and chemical stability of drug nanoparticles. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 63, n. 6, p. 456–469, 2011.

XU, J.; KOELLING, K. W. Temperature dependence of rheological behavior of a metallic automotive waterborne basecoat. **Progress in Organic Coating**, v. 53, p. 169–176, 2005.

YAPAR, E. A.; INAL, Ö. Poly (ethylene oxide)– Poly (propylene oxide) -Based Copolymers for Transdermal Drug Delivery : An Overview. **Tropical Journal of Pharmaceutical Research**, v. 11, p. 855–866, 2012.

ZAIDI, M. R.; MERLINO, G. The two faces of interferon- γ in cancer. **Clinical Cancer Research**, v. 17, n. 19, p. 6118–6124, 2011.

ZHOU, Q.; ZHANG, Z.; CHEN, T.; GUO, X.; ZHOU, S. Preparation and characterization of thermosensitive pluronic F127-b-poly(ϵ -caprolactone) mixed micelles. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 86, p. 45–57, 2011.

ZHOU, S.; SUN, J.; SUN, L.; DAI, Y.; LIU, L.; LI, X.; WANG, J.; WENG, J.; JIA, W.; ZHANG, Z. Preparation and characterization of interferon-loaded magnetic biodegradable microspheres. **Journal of Biomedical Materials Research**, v. 87, p. 189–196, 2008.

APÊNDICE**TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO****Projeto:**

DESENVOLVIMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE NANOEMULSÕES E NANOPARTÍCULAS PARA VEICULAÇÃO DE INTERFERON GAMMA E AVALIAÇÃO DE SEU POTENCIAL IMUNOMODULADOR

Pesquisadores e instituições envolvidas: Prof.^a Dr.^a Maria Aparecida Godoy Soler, Prof.^a Dr.^a Adenilda Cristina Honório França, Prof. Dr. Eduardo Luzia França e discente doutorando em Nanociência e Nanobiotecnologia ELTON BRITO RIBEIRO – Universidade de Brasília (UNB) / Universidade Federal de Mato Grosso (UFMT).

Eu....., fui informado dos objetivos, procedimentos, riscos e benefícios desta pesquisa, descritos acima. Entendo que terei garantia de confidencialidade, ou seja, que apenas os resultados dos exames realizados com o sangue serão divulgados e ninguém, além dos pesquisadores, terá acesso aos nomes dos participantes desta pesquisa. Entendo também, que tenho direito de receber, sempre que desejar, outras informações sobre o estudo, entrando em contato com a pesquisador (Elton Brito Ribeiro) e qualquer dúvida adicional, você poderá entrar em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa, através do fone: (66) 34055317. Compreendendo tudo o que me foi explicado sobre o estudo e, estando de acordo em participar, assino embaixo.

Assinatura do participante (ou do responsável, se menor):

.....

Assinatura do pesquisador principal:

.....

Doutorando: ELTON BRITO RIBEIRO

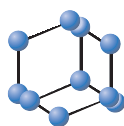
Fone: (66) 9218-1802 E-mail: eltonbr8@hotmail.com

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Maria Aparecida Godoy Soler

Fone: (61) 81346201 E-mail: soler@unb.br

ANEXO

Ribeiro, E. B.; Honorio-França, A. C.; França, E. L.; Soler, M. A. G.. **Design and development of nanoemulsion systems containing interferon gamma**. Protein & Peptide Letters, v. 23, 2016. doi: 10.2174/0929866523666160502155249. Upcoming Articles 2016. (E-pub ahead of print).



**BENTHAM
SCIENCE**

Design and Development of Nanoemulsion Systems Containing Interferon Gamma



Elton B. Ribeiro^{a,b}, Adenilda C. Honorio-França^c, Eduardo L. França^c and Maria A. G. Soler^{a,d,*}

^aInstituto de Ciências Biológicas, Universidade de Brasília Brasília-DF, 70910-900, Brazil; ^bInstituto de Ciências da Saúde, Campus Universitário de Sinop, Universidade Federal de Mato Grosso, Sinop-MT, 78550-356, Brazil; ^cInstitute of Biological and Health Science, Federal University of Mato Grosso, Barra do Garças-MT, 78600-000, Brazil; ^dInstituto de Física, Universidade de Brasília, Brasília-DF 70910-900 Brazil



Maria A. G. Soler

Abstract: The aim of this study was to design and develop stable nanoemulsion formulations containing IFN- γ to probe their use as an immunomodulating agent. The nanoemulsions comprising distilled water, triglycerides of capric acid/caprylic, sorbitan-oleate (SP), polysorbate 80 (TW) and propylene glycol (PG) were prepared through ultra-homogenization and characterized regarding droplet size, polydispersity, surface charge, preliminary and accelerated physical stability, and rheological properties. Stable nanoemulsions were selected to incorporate nano doses of IFN- γ (100 ng.mL⁻¹). The influence of IFN- γ incorporated nanoemulsions on functional activity of mononuclear cell for *Escherichia coli* enteropathogenic was analyzed through superoxide release, phagocytosis, microbicidal activity and intracellular calcium release. The optimized formulation, comprising aqueous and oily phase of 10 % and 80 %, respectively, and surfactant mix ratio (SP/TW/PG) of 3.5/5.5/1.0, remained stable in extreme conditions during 90 days, displaying oil-in-water characteristics, biocompatible pH value, significant maintenance of its rheological profile, hydrodynamic radius of 205 nm, zeta potential of -40 mV and average dose of IFN- γ 91 ng.mL⁻¹. The developed formulation did not alter the MN cell viability rates. Increased the superoxide release, phagocytosis index and intracellular calcium release of MN cells of human blood. Our findings indicate that the produced formulation improved the immunomodulatory activity of the IFN- γ .

Keywords: Nanoemulsion, Immunomodulation, IFN- γ , MN cells, Drug delivery.

Received: January 18, 2016

Revised: April 27, 2016

Accepted: April 29, 2016

1. INTRODUCTION

The development of drug delivery systems (DDS) has grown significantly enabling the enhancement of drug stability and pharmacological activity by modifying its distribution and providing protection from toxicity and degradation. Further, the possibility of administrating drugs and biomarkers result in remarkable advances in therapeutic procedures [1,2]. Model of DDS current employed are micro/nanocapsules [3], polymer-drug conjugates [4,5], liposomes [6], micro and nanoemulsions [7,8], magnetic nanoparticle [9], polymeric micelles [10]. Among DDS micro and nanoemulsions have been successfully applied in the pharmaceutical industry, encapsulating, protecting and delivering bioactive components [11-14]. Nevertheless, these systems display different behaviors, once microemulsion colloidal dispersions are thermodynamically stable, while nanoemulsions (NEs) are not. Furthermore, the preparation synthesis routes, as well as the stabilization processes, and the approaches required to design their functional attributes, are different.

Several works have reported formulation of nanoemulsion by ultra-homogenization emulsification, but it was stable for few weeks only [15,16]. In addition, NEs have been highlighted not only to improve the conventional emulsion systems but also to enable new DDS designed systems with better bioavailability, delivery in specific target and accurate nano dosing formulations providing minimum side effects [7,17,18]. However, a thorough knowledge of the formulation process is necessary to increase their applications.

NEs are fine oil-in-water (O/W) or water-in-oil (W/O) colloidal dispersions depending on whether the oil is dispersed as droplets in water, or vice versa, with one of the liquids being dispersed as small spherical droplets ($r < 100$ nm) in the other liquid. Sometimes NEs are stabilized by an interfacial film comprising a combination of surfactant/co-surfactant [3,16]. As for instance, in an O/W structure, the non-polar tails of the surfactant molecules protrude into the hydrophobic core formed by the oil phase, while the polar head groups of the surfactant molecules protrude into the surrounding aqueous phase [3]. NEs are transparent and kinetically stable but characterized by a long-term physical stability of droplets in suspension due to their very small size, and significant steric stabilization between droplets

*Address correspondence to this author at the Instituto de Física, Universidade de Brasília Brasília-DF, 70910-900, Brazil; Tel: +55-6131077773; Fax: +55-6131077712; E-mail: soler@unb.br

[15,16,19]. Moreover, due to their unique properties, the broad range of NEs applications span from nanomedicine to personal care and cosmetics [20,21].

The therapeutic administration of cytokines has been introduced aiming to modulate the immune response, to seek different approaches to face pathologies such as cancer, auto immune and infectious diseases. Few studies have been conducted to find adequate formulations and administration routes to reach these selected therapeutic goals [22-24]. Furthermore, nanostructured complexes loading cytokines have been produced, and it was found that liberation of stimulus can be modified, by acting on the immune system [25-27]; allowing an immunomodulation to protect the organism from excessive pro-inflammatory activity, and providing an efficient immune response [28-30]. For instance, some studies dealing with DDS comprising liposomes [31-34], micro and nanoparticles [35] to load cytokines such as, interferon- α (IFN- α), or interferon- γ (IFN- γ) were developed, aiming applications in tumor therapy and vaccines [31,33,35,36].

Interferons are cytokines that play a complex and central role in the resistance of mammalian hosts to pathogens. Type I interferon (IFN- α , and IFN- β) is secreted by virus-infected cells, while the immune type II, or γ -interferon (IFN- γ), is secreted by thymus-derived (T) cells, under certain conditions of activation and by natural killer (NK) cells [37,38]. In particular, the IFN- γ is a pleiotropic cytokine, endowed with potent immunomodulatory effects on a variety of immune cells *in vitro* and *in vivo* [39-41]. It is a key proinflammatory cytokine against infection that is involved in various biological process such as: (i) defense mechanisms; (ii) the establishment of autoimmunity and inflammatory processes; (iii) phagocytes, microbicidal and tumoricidal controls in monocytes/macrophages; (iv) the expression of histocompatibility antigens (MHC) class II; (v) the production of macrophage derived mediators such as TNF-alpha, IL-1, IL-12 and nitric oxide; and (vi) downregulation of the synthesis of inflammatory mediators such as IL-10 [37,42-44]. IFN- γ is considered to be the key player in inflammatory responses, by interfering in the cell functions of the immune system [45,46].

To overcome the limited success reached up to now by the interferon based therapies, the development of DDS enabling drug reaching specific targets, with adequate doses, is mandatory [38]. In addition, biomaterials are being designed aiming to reduce apoptosis in organs which cytokines can be considered toxic [47]. Moreover, in a previous study, we found that phagocytes incubated with nano doses of IFN- γ are able to modulate the functional activity of cells [46]. Further, the action of cytokines released by nanostructured systems on the immune activity of human blood phagocytes is not well understood [28-30].

In this context, we aimed to design and develop stable nanoemulsion formulations containing IFN- γ to probe the modulation of functional activity of human peripheral blood phagocytes. The choice of the proportions of the components to produce NEs was made by selecting formulations from phase diagrams. Stability studies were performed on selected NEs formulations, as well as, accelerated stability studies, to attain optimized NEs loading IFN- γ . In addition, biological assays, comprising cell viability, evaluation of phagocytosis and bactericidal activity, superoxide anion and intracellular

calcium release, were conducted utilizing human peripheral blood.

2. MATERIALS AND METHODS

2.1. Reagents

The propylene glycol, sorbitan oleate, polysorbate 80 and IFN- γ used in the study were purchased from Sigma[®], USA. The human IFN- γ lyophilized powder, cell culture tested and employed being diluted in phosphate buffered saline (PBS) up to reach the concentration of 100 ng.mL⁻¹. Capric/caprylic acid triglycerides was purchased from Henrifarma[®], Brazil. All other reagents and chemicals used were of analytical grade.

2.2. Preparation of Nanoemulsion Formulations

Considering that IFN- γ is soluble in aqueous medium, and the results from preliminary experiments indicated that PBS solution containing IFN- γ is highly stable [46], the oil in water emulsion system was selected. NEs were developed employing the ultra-homogenization technique [8] using the equipment Ultra-Turax (IKA[®], Campinas, Brazil). The synthesis process was performed through the following steps: (i) the ratio (w/w) of the surfactants, while keeping the co-surfactant ratio of 10% of surfactant mixture, was calculated to obtain an hydrophilic-lipophilic balance (HLB) required by the oil phase [7]; (ii) the proportion of each component (oil phase, aqueous phase, and surfactant mixture) runs from 10 to 80%, of the formulation following by ultra-homogenization; (iii) construction of pseudoternary diagrams comprising points representing each proportion of components. After 72 h each formulation was visually classified in NE, gel or liquid emulsions, and phase separation attaining a preliminary diagram; (iv) in addition, the definition of the regions, of each formulation phase, were improved by performing aqueous titration with the ratio of oil phase/surfactants running from 1:9 up to 9:1. Formulations corresponding to the NE region were pre-selected and submitted to stability studies.

The co-surfactant propylene glycol was fixed as 10% (co-surfactant fraction, $F_c = 1$) of surfactant mixture, and the ratio (w/w) of the surfactants to obtain the HLB, required by the (CCT-oil, HLB= 10.8) was calculated. The mixture of surfactants and co-surfactant fractions for sorbitan oleate (SP), polysorbate 80 (TW) and propylene glycol (PG), respectively, was labelled S_{mix} . Several samples were prepared by varying the proportion of each component oil phase, aqueous phase, and surfactant mixture, from 10 to 80%, of the formulation, followed by gradual ultra-homogenization starting from 5.000 rpm.mim⁻¹ up to 24.000 rpm.mim⁻¹. The samples were visually rated after 72 hours at 25°C for NE liquid region, gelling (GE) or liquid emulsion (LE), and phase separation (PS) characteristics.

Titration were performed on aqueous mixtures with oil phase/surfactant mass ratios of 1:9 up to 9:1 under agitation to obtain the delimiting points, area and classification of different systems to delimit the regions in the diagram. The titration was performed by adding distilled water in quantities between 0.05 mL and 0.20 mL. During this process, the

mixture was agitated both manually and mechanically. After homogenization of each titrant, the formulation volumes were visually classified. Diagrams to define the composition of each type of formulation were constructed from data attained using Sigma Plot 8.0 software.

After pseudoternary diagram acquisition, composition of the systems that fall into the NE region can be defined. This region contained pre-selected points were distributed in lines dividing the region to achieve representative samples that will be further characterized.

IFN- γ incorporation in the nanoemulsion samples was performed by adding the equivalent volume of aqueous phase, employed to prepare NEs, of IFN- γ in PBS, under agitation, followed by surfactant and (CCT-oil) addition, respectively. Each system was formulated to attain a final dispersion comprising 100 ng.mL⁻¹ of IFN- γ measured using a flow cytometer (FACSCalibur, BD Biosciences, USA). The data were analyzed using the FCAP Array 1.0 software. These formulations were labeled nanoemulsion interferon- γ (NEIFN- γ).

2.3. Physicochemical Characterization

Physical and chemical parameters of the formulations were measured 24 h after preparation and at the end of the stability study. These tests were performed in triplicate (n = 3) samples.

Aliquots of some pre-selected vehicles were centrifuged at 160 ×g for 30 minutes at room temperature, and 5°C. After centrifugation, the samples with visual heterogeneity were excluded.

Vehicle pH was measured and the electrode was inserted directly into the sample to assess its stability against possible decomposition reactions such as hydrolysis.

Electrical conductivity was obtained by inserting the electrode directly into the sample to confirm the system type oil in water (O/W) and any tendency towards phase inversion.

The mean particle size and polydispersity index (PDI) were measured at 25°C by dynamic light scattering (DLS) using a Malvern Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments, Malvern®, UK) 632.8 nm excitation. The zeta potential was measured in the same equipment. Colloidal suspension samples (in triplicate) were prepared from a 10:1000 dilution of the formulation.

2.4. Stability Studies on Optimized Nanoemulsions

The thermodynamic stability assessment was performed through heating-cooling cycle. Two group of samples were preliminarily subjected to alternating cycles of 5±1°C and 40±1°C for 24 hours each, during 14 days. The formulations that were found to be stable at these temperatures were subjected to accelerated stability. In these extreme conditions it is possible to probe their long term stability. Three groups of colloidal samples were submitted (in triplicate) alternatively at temperatures of 40±1°C, 25±1°C and 5±1°C for a period of 90 days. At 45 days, the formulations were maintained at room temperature for 24 hours to measure the physicochemical properties and to reassess the rheological profiles.

The formulations that passed these tests were selected for IFN- γ incorporation. These loaded samples were submitted to accelerated stability procedure. The concentration of IFN- γ in the formulations was measured.

2.5. Rheological Characterization

Rheological parameters of as prepared NE formulations was measured without dilution, using a Modular Compact Rheometer-MCR 102 (Anton Paar®, Germany GmbH, Ostfildern, Germany) as previously describe [48]. In short, 600 μ L of sample was added to the reading plate surface. Data were taken with continuous control of the gap measurement using the support TruGap™ in 0.099 mm. The measuring cell was a Toolmaster™ CP 50, and precise temperature control was achieved through T-Ready™. Acquired data were treated using the Rheoplus V3.61 software. The flow and viscosity curves were displayed using established parameters considering the control of shear stress (τ) in the range 0–5 Pa for the upswing and 5–0 Pa for the curve downward. These measurements were performed under isothermal conditions at 25°C, comprising 75 readings for each analysis.

The viscosity curves as a function of temperature were measured under fixed control of shear stress (τ) at 1 Pa, in the temperature range from 5±0.1 to 45±0.1 °C, and a heating rate of 1.0±0.1 °C min⁻¹. Parameters were recorded at every 1.0±0.1 °C, total of 41 readings for each analysis.

2.6. Biological Assays

2.6.1. Subjects

Samples of 15 mL of blood were collected from 15 healthy volunteers, both sexes and aged 18 to 40. Blood samples were stored in EDTA (25 U.mL⁻¹) tubes. The volunteers signed an informed consent form that was approved by the Federal University of Mato Grosso Ethics Committee N° 1.018.274, before initiating the study.

After collection procedure, the samples were centrifuged at 160 ×g for 40 min at room temperature, to isolate plasma from the cells. Cells were separated over a Ficoll-Paque gradient (Pharmacia, Upsala, Sweden) to produce samples with 95% pure mononuclear cells as analyzed by light microscopy. The enriched mononuclear phagocytes ring was removed and reserved. Mononuclear cells were washed twice in PBS, setting up the concentration to 2x10⁶ cells.mL⁻¹, using a Neubauer chamber, being available for further analyses.

2.6.2. *Escherichia coli* Strain

Stock culture of enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) was isolated from stools of an infant with acute diarrhea (serotype 0111:H⁻ AL⁻, eae⁺, eaf⁺, bfp⁺) and maintained at room temperature under dark conditions. These bacteria culture were prepared and adjusted to 1x10⁷ bacteria mL⁻¹, as previously describe [49].

2.6.3. Superoxide Anion Release

Superoxide anion release was obtained by reduction of cytochrome C. Initially, mononuclear phagocytes and bacteria were mixed and incubated during 30 minutes to assess phagocytosis. After this period the suspension was centri-

fused (10 min; 160 \times g) and the supernatant was discarded. Following, this suspension was resuspended in PBS containing 2.6 mM CaCl_2 , 2 mM MgCl_2 , and cytochrome C. The suspensions (150 μL) were incubated for 60 min at 37°C on culture plates (96 wells) with addition of stimulus. A control was performed using only the spontaneous release of cells. The reaction rates were attained by absorbance at 550 nm, and the results were expressed as $\text{nmol}/\text{O}^{-2}$. All of the experiments were performed in duplicate.

2.6.4. Cell Viability and Bactericidal Assay

Cellular viability, phagocytosis and microbicidal activity were evaluated using acridine orange method [50]. Cells were pre-treated with cytokines and developed formulations, incubated at 37°C for 30 minutes and resuspended in PBS and centrifuged. The supernatant was discarded, and the sediment was dyed with 200 μL acridine orange [$14.4 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$] for 1 min. The sediment was resuspended in cold PBS, washed twice and observed by immunofluorescence microscopy (Nikon Eclipse E-200, Japan) at 400 \times and 1000 \times magnification. The viability index was calculated by counting the number of orange-stained (dead) and green-stained (alive) cells out of 100.

Equal volumes of bacteria and cell suspensions were mixed and incubated at 37°C during 1 h under continuous shaking. Phagocytosis was stopped by incubation on ice. Aiming to eliminate extracellular bacteria, the suspensions were centrifuged twice (160 \times g, 10 minutes, 4°C). Afterwards, cells were resuspended in PBS and centrifuged. The supernatant was discarded, and the sediment was stained with 200 μL of acridine orange [$14.4 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$] for 1 min. The sediment was resuspended in PBS, washed three times under centrifugation (10 min a 160 \times g), and observed in an immunofluorescence microscope at 400 \times and 1,000 \times magnification. The phagocytosis index was calculated by counting the number of cells that ingested at least three bacteria in a pool of 100 cells. The bactericidal index was calculated as

the ratio between orange-stained (dead) and green-stained (alive) bacteria $\times 100$. All of the experiments were conducted in duplicate.

2.6.5. Intracellular Ca^{2+} Release

Intracellular Ca^{2+} release was performed using the chromogen Fluo-3. Cell suspension were centrifuged twice (160 \times g, 10 min at 4°C) and resuspended in PBS containing bovine serum albumin (BSA - $5 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$), followed by addition of 25 μL of stimulus and incubated with 5 μL of Fluo-3 ($1 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$), during 1 h at 37°C. After that, cells were washed twice in PBS containing BSA (160 \times g, 10 min, 4°C). Fluo-3 was detected using the 530/30 nm filter for intracellular Ca^{2+} . The proportion of released Ca^{2+} was given through the geometric mean (%) fluorescent intensity of Fluo-3.

2.7. Statistical Application for Analysis of Data

Statistical analyses were performed using the BioEstat 5.0 software. Statistically significant differences in physicochemical and of biological assays in the presence of nanoemulsions were evaluated using analysis of variance (ANOVA) and Tukey's multiple comparison test. Statistical significance was considered when the p-value was less than 0.05 ($P < 0,05$).

3. RESULTS

3.1. Selection of Nanoemulsion Formulations

To obtain the surfactant mixing ratio, the co-surfactant concentration was fixed as 10%, and the amount of surfactants SP and TW were calculated to achieve the required oil phase CCT-oil HLB [7]. The obtained surfactant fractions were 3.5 and 5.5 for SP and TW, respectively, resulting in the Smix relation of 3.5:5.5:1.0.

Phase behavior studies were performed by constructing pseudoternary phase diagrams providing information on the

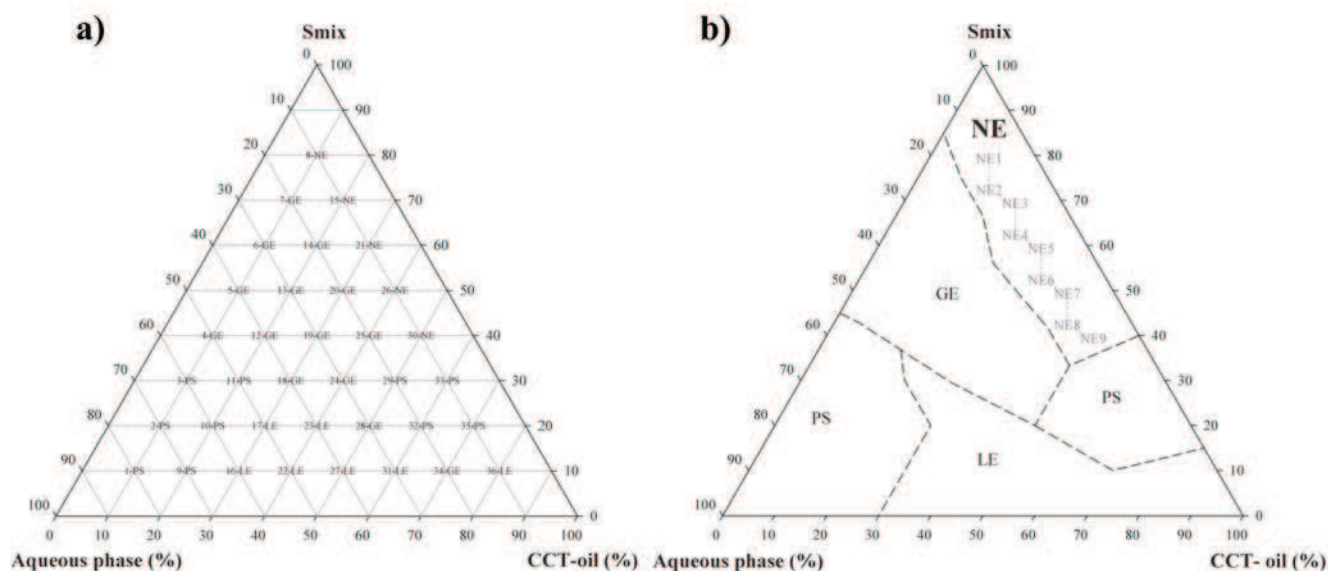


Figure 1. Pseudoternary diagrams indicating oil-in-water nanoemulsion (NE1 to NE9) regions, classification of points (a) and region domains with selected nanoemulsions (b) SP/TW/PG system.

Abbreviations: nanoemulsion (NE), gel emulsion (EG), liquid emulsion (EL), Phase Separation (SF)

boundaries of the different phases as a function of composition of oil phase (CCT-oil), aqueous phase (AQ), and Smix (3.5:5.5:1.0), varying from 20 to 80%, of the formulation (Fig. 1a). These data resulted in 36 points with different equilibrium characteristics. Homogeneous and translucent systems can be observed predominating in the region with Smix higher than 35% indicating points with thermodynamic equilibrium characteristic (Fig. 1a). Figure 1(b) displays the pseudoternary diagram with delimited domains, attained from the diagram points (Fig. 1a) and aqueous titrations. Through the analysis of phase behavior, it is possible to classify different regions as liquid NE, gelling (GE), liquid emulsion (LE), and phase separation (PS). Analysis of the phase behavior indicated that a large range of surfactant compositions produced stable systems. However, when the domain Smix concentration is below 40%, some instability and phase separation were also observed, indicating that these surfactant concentrations could not balance high proportions of aqueous and oily phases (Fig. 1(b)). The samples labelled NEx, $x=1$ to 9, corresponding to the nanoemulsion region, were pre-selected and submitted to rheological characterization. In a second step, NE samples passed through rheological tests were employed to synthesize DDS, by substituting the aqueous phase content with the PBS solution containing IFN- γ . Nanoemulsions incorporating IFN- γ were labelled by adding IFN- γ to their initial names.

3.2. Physicochemical Characterization

Rheological characterization was performed by attaining the flow and viscosity curves, as a function of shear rate, and viscosity as a function of temperature. Initially, flow curves of the pre-selected NE formulations (NE1 to NE9) were measured (Fig. 2a). It is observed that for some samples NE1, NE2, NE3, NE5, and NE7, the flow curve began at the origin and then exhibited linear ascending, and descending behavior, indicating that these formulations behave as Newtonian fluids. Otherwise, samples NE4, NE6, NE8 and NE9 exhibited nonlinear behavior, being considered as non-Newtonian, and were rejected. In addition, viscosity curves of samples passing the first test, as a function of shear rate, are displayed in Fig. 2b. It is observed that the viscosity values did not change as the shear rate increases, with values between 0.2 and 0.6 Pa.s. Otherwise, sample NE2 shows a dependence of the viscosity with the shear rate, being discarded. In addition, curves of viscosity as a function of temperature, in the range from 5 up to 45 °C were also recorded (Fig. 2c). It is observed that the viscosity decreases monotonically as the temperature increases for the majority of the samples, while sample NE7 shows high fluctuation of viscosity values and was therefore eliminated.

IFN- γ was incorporated in samples presenting the characteristics of nanoemulsions that passed through first rheological tests, namely NE1, NE3 and NE5, being labelled as NE1IFN- γ , NE3IFN- γ and NE5IFN- γ . Fig. 3a and b present the flow and viscosity curves, respectively, for IFN- γ incorporated samples presenting the same behavior of that displayed by NEs (Fig. 2a and b), and the viscosity values change from 0.25 up to 0.5 Pa.s. Fig. 3c shows the curves of viscosity as a function of temperature. It is important to point out that the introduction of IFN- γ did not affect the stability of the NEs.

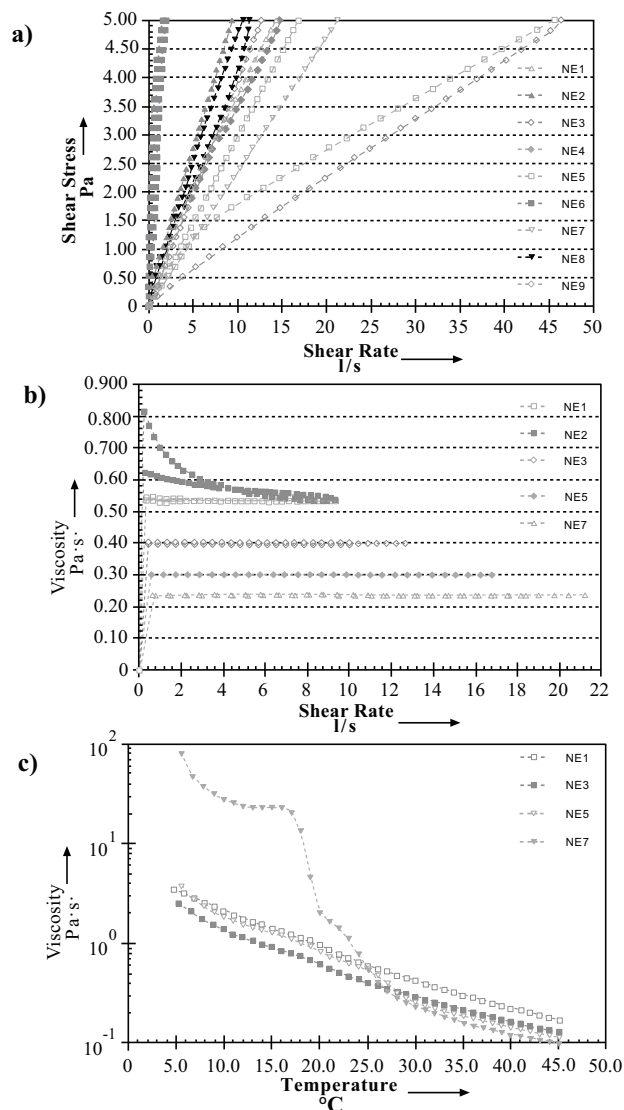


Figure 2. Flow curve (a), viscosity (b) at 25°C and viscosity curve (c) under temperature running from 5 up to 45°C of preselected nanoemulsion (NE).

Droplet size analysis and particle size distribution attained by the DLS technique for samples NE1, NE3, NE5, NE1IFN- γ , NE3IFN- γ and NE5IFN- γ are displayed in Fig. 4a. It is observed that IFN- γ loaded samples present lower sizes and thinner distribution, compared with NE samples. Zeta potential (ζ), polydispersity index, and hydrodynamic diameter values for the same samples are listed in Table 1. These data suggested that sample NE5IFN- γ should be eliminated, once it presented ζ potential towards zero, indicating no ionic stabilization; high polydispersity index, and the highest hydrodynamic droplet size, as observed in Table 1. Therefore, up to this point, the pre-selected samples are NE1, NE3, NE1IFN- γ , and NE3IFN- γ .

3.3. Stability Studies

Stabilities studies were performed in pre-selected stable formulations. The results of the physicochemical analyses,

Table 1. Zeta potential, polydispersity index, and average hydrodynamic diameter of preselected nanoemulsions developed (NE) and interferon gamma nanoemulsion developed (NEIFN- γ).

Formulation	Assay		
	Zeta Potential (mV)	Polydispersity index	Hydrodynamic diameter (nm)
NE1	-37.96	0.329	251.23
NE3	-41.27	0.305	316.83
NE5	-32.30	0.156	429.30
NE1IFN- γ	-34.43	0.407	204.95
NE3IFN- γ	-38.00	0.372	183.07
NE5IFN- γ	0.00	0.191	1074.45

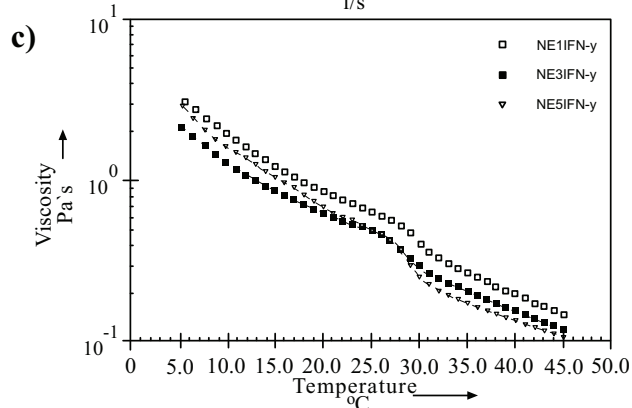
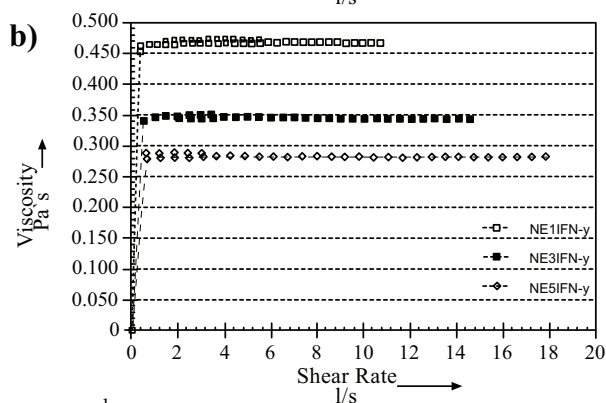
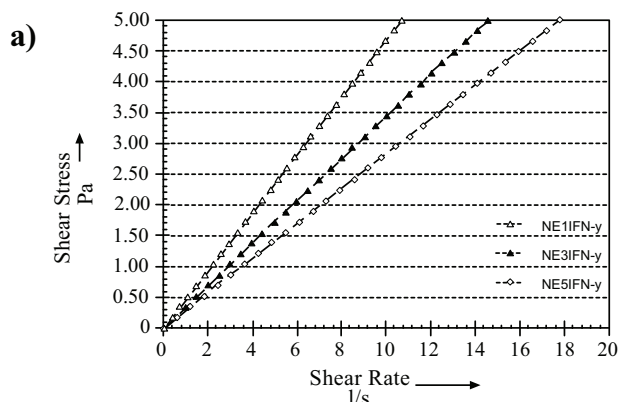


Figure 3. Flow curve (a), viscosity (b) at 25°C and viscosity curve (c) under temperature programming from 5 to 45°C of interferon gamma nanoemulsion (NE1IFN- γ , NE3IFN- γ , and (NE5IFN- γ).

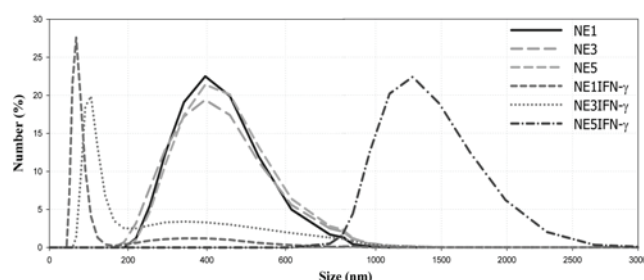


Figure 4. Droplet size distribution of preselected nanoemulsions (NE1, NE3, and NE5) and interferon gamma nanoemulsion (NE1IFN- γ , NE3IFN- γ , and (NE5IFN- γ).

attained before and after submitting samples to temperature variations, are listed in Table 2. After thermal treatments, samples were submitted to centrifuge at 160 \times g for 30 minutes at 5°C and 25 °C. The samples with no phase separation were considered normal (N). Further, it was observed that all studied samples presented a visually normal behavior, remaining translucent before and after the stability test, showing high stability. Afterwards, formulations containing IFN- γ were further submitted to accelerated stability studies.

Data attained from IFN- γ loading samples submitted to heating-cooling temperature cycles before starting (0), after 45 and 90 days under extreme temperature variation tests, are listed in Table 3. According with conductivity data, all formulations were classified as O/W because they had electrical conductivity values above that of distilled water ($>1.3 \mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$). The pH values obtained before and after the stability tests remained between 6.0 and 7.0, showing small decrease, compared with values attained before the treatment, while conductivity values show O/W characteristics over the whole trial period. Therefore, formulations displayed visual homogeneity being translucent during all the time of tests. Further, ζ potential remained stable (-36 mV) for sample NE1IFN- γ , and changed from -38 to -34 in the case of sample NE3IFN- γ . Viscosity values remained constant during the treatment time, while the IFN- γ dose decreased for both samples from 118 to 72 and 101 to 79 $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$, for NE1IFN- γ and NE3IFN- γ , respectively. The hydrodynamic diameter increased for both samples, running from 205 up to 352, and 183 up to 395 nm, for NE1IFN- γ and NE3IFN- γ , respec-

Table 2. Physicochemical characteristics attained from preliminary stability tests of preselected Nanoemulsions (NE1 and NE3) and formulations (NE3IFN- γ , NE3IFN- γ).

Formulation	Centrifugation		Aspect		Conductivity ($\mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$)		pH	
	$\sim 25^\circ\text{C}$	$\sim 5^\circ\text{C}$	Before	After	Before	After	Before	After
NE1	N	N	TL	TL	2.39	3.01	7.20	7.22
NE3	N	N	TL	TL	2.26	2.52	7.40	7.50
NE1IFN- γ	N	N	TL	TL	7.61	8.08	7.10	7.00
NE3IFN- γ	N	N	TL	TL	7.20	7.25	7.20	7.00

Abbreviations: N = Normal; TL = translucent liquid; Nanoemulsion (NE); Nanoemulsion formulations developed (NE IFN- γ). N = Normal: no phase separation after the thermal treatment

Table 3. pH, conductivity, ζ Potential, hydrodynamic size, and interferon gamma (IFN- γ) concentration obtained before starting (0) the heating-cooling temperature cycles, after 45, and 90 days of formulations NE1IFN- γ and NE3IFN- γ .

Assay	Formulation	Time (days)		
		0	45	90
pH	NE1IFN- γ	7.10 \pm 0.01	6.51 \pm 0.16	6.00 \pm 0.10
	NE3IFN- γ	7.00 \pm 0.05	6.22 \pm 0.49	6.68 \pm 0.36
Conductivity ($\mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$)	NE1IFN- γ	6.74 \pm 0.10	7.72 \pm 0.54	7.81 \pm 0.18
	NE3IFN- γ	4.84 \pm 0.10	7.13 \pm 2.23	6.20 \pm 3.20
ζ Potential (mV)	NE1IFN- γ	-36.20 \pm 4.53	-36.10 \pm 0.28	-36.13 \pm 0.35
	NE3IFN- γ	-38.27 \pm 3.31	-34.53 \pm 0.83	-34.43 \pm 0.17
Hydrodynamic size (nm)	NE1IFN- γ	204.95 \pm 10.48	347.57 \pm 36.40	352.17 \pm 19.88
	NE3IFN- γ	183.07 \pm 7.56*	435.63 \pm 40.99	394.53 \pm 65.40
IFN- γ (ng.mL $^{-1}$)	NE1IFN- γ	118.08 \pm 37.18	82.39 \pm 37.04	72.13 \pm 36.90
	NE3IFN- γ	101.48 \pm 33.94	78.20 \pm 39.18	79.41 \pm 36.56
Viscosity (Pa.s)	NE1IFN- γ	0.53 \pm 0.01	0.54 \pm 0.01	0.52 \pm 0.02
	NE3IFN- γ	0.42 \pm 0.01	0.40 \pm 0.01	0.39 \pm 0.03 [#]

Abbreviations: *To compare the test time the same group has been considered. * F =27.4829, p < 0.01; [#] F = 4314.38, p < 0.0001.

tively. According to attained rheological parameters and physicochemical characteristics, the NE1IFN- γ formulation (10% oil, 10% aqueous phase, and 80% surfactants) present higher stability, than the NE3IFN- γ , has been selected to conduct biological assays.

3.4. Biological Assays

3.4.1. Cell Viability

Cell viability of cells incubated in PBS and NE containing IFN- γ , just incubated (0 h), after 0.5 and 24 h, are shown in Fig. 5. It is observed that cells in the presence of NE1IFN- γ displayed higher viability (98.0 \pm 2.4; 97.8 \pm 1.3 and 92.2 \pm 4.3 %) than the control cells namely (92.2 \pm 3.0; 92.2 \pm 1.5 and 83.4 \pm 3.8) in the window time studied.

3.4.2. Modulation of Blood Phagocyte Functional Activity by IFN- γ Loaded Nanoemulsion

In this study, mononuclear phagocytes in the presence of bacteria were compared with spontaneous release. Higher superoxide release, regardless of bacterial presence, was observed when phagocytes were incubated in nanoemulsions (NE1 or NE1IFN- γ) (Fig. 6).

The phagocytosis and microbicidal activity of blood phagocytes, in the presence of enteropathogenic *Escherichia coli*, were investigated with IFN- γ dissolved in PBS, NE1, and NE1IFN- γ samples, while the control group was formed by blood phagocytes in PBS. Data listed in Table 4 shows that the cells and EPEC incubated with NE1IFN- γ displayed the higher phagocytic index (68.8 \pm 4.3%) than that attained for NE1, or even IFN- γ in PBS (40.4 \pm 17.7%). Otherwise, NE1IFN- γ did not affect the microbicidal activity of blood phagocyte, as observed in (Fig. 6).

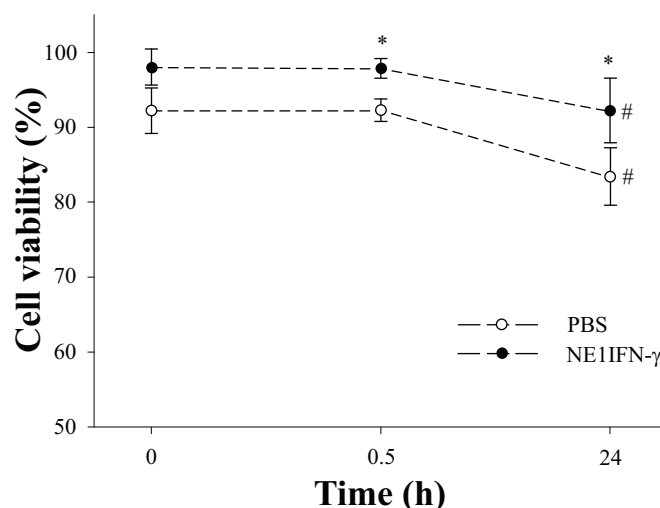


Figure 5. Cell viability index of blood mononuclear phagocytes at different incubation times in the presence of developed nanoemulsion formulation (NE1IFN- γ).

(ANOVA) - *Comparing the control group with the group treated considering the same incubation time. $F = 12.8818$ and $p < 0.0003$; $F = 9.217$ and $p < 0.0012$ (ANOVA). # Compared incubation times to the same treatment. $F = 15.0661$, $p < 0.0001$ and $F = 4.5191$, $p < 0.0338$. Abbreviations: Phosphate buffer (PBS).

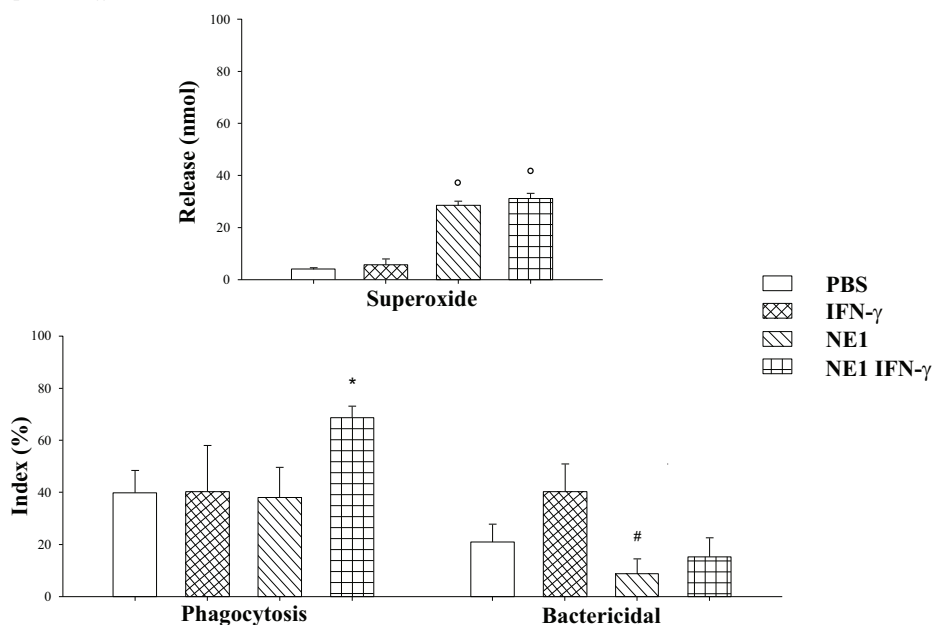


Figure 6. Superoxide release, phagocytic, and bactericidal index of mononuclear blood phagocytes stimulated by interferon gamma (IFN- γ), nanoemulsion (NE1); developed nanoemulsion formulation (NE1IFN- γ).

(ANOVA) - comparing the control group (no treatment) with the treatment group. * $F = 8.4092$ and $p < 0.0001$; # $F = 9.1092$ and $p < 0.0001$; ° $F = 259,3968$, $p < 0.0001$. Abbreviations: Phosphate buffer (PBS).

3.4.3. Intracellular Ca^{2+} Release

Studies on intracellular Ca^{2+} release were performed in phagocytes treated with nanoemulsions, PBS plus BSA solution, and IFN- γ by flow cytometry (Fig. 7). It is observed that phagocytes incubated with NE1IFN- γ increase the Ca^{2+} release, when compared with phagocytes from the control group and IFN- γ .

4. DISCUSSION

In this investigation, we developed a stable oil-in-water nanoemulsion system, loading nano doses of IFN- γ . Our

findings demonstrate that this formulation improved the immunomodulatory activity of the IFN- γ , highlighted by the increasing of superoxide anion release, phagocytosis, and intracellular calcium release of human blood MN cells.

The stability of emulsion systems depends intrinsically on interphase interactions established by the emulsifier agent, and on interface characteristics between the immiscible phases. The selection of surfactant play a key role to design a stable emulsion [17]. A flexible fluid interfacial film is rarely achieved by the use of single surfactant, and the addition of a co-surfactant is normally required. Further, the co-

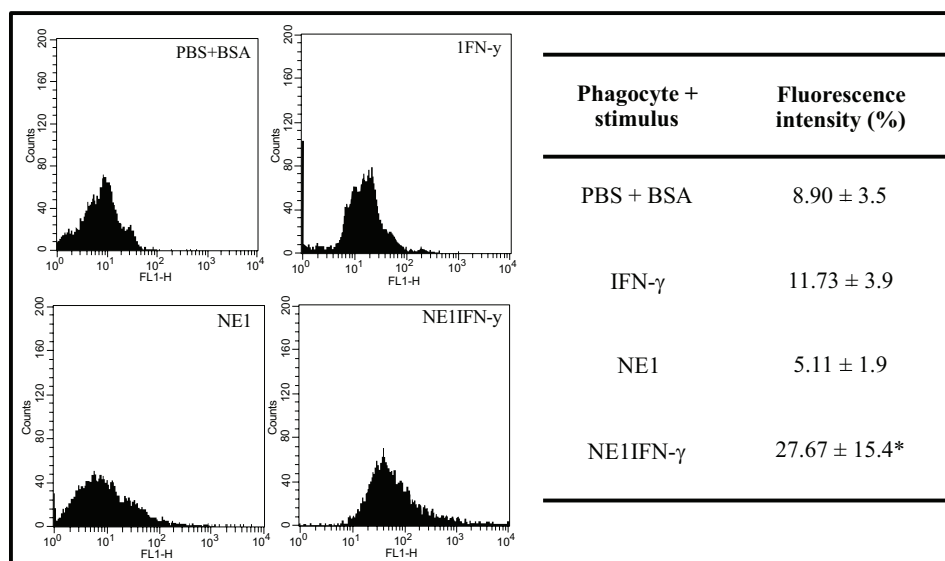


Figure 7. Intracellular Ca^{2+} release from average of mononuclear phagocytes blood stimulated by interferon gamma (IFN- γ), nanoemulsion (NE); developed nanoemulsion formulation (NE1IFN- γ) indicated by fluorescence intensity. (ANOVA) – comparing the control group (no treatment) with the treatment group. * $F = 10.4259$ and $p < 0.05$. Abbreviations: Phosphate buffer + bovine serum albumin (PBS+BSA).

surfactant reduces the necessary concentration of surfactants, increase the mobility of chains of hydrocarbons increasing the efficiency of emulsification [19]. In spite of NE are not thermodynamically stable, a high stability have been attained by optimizing the concentration of surfactants through HLB values [20,51,52]. In this investigation, sorbitan oleate (SP), polysorbate 80 (TW) were used as surfactant, along with propylene glycol (PG), the co-surfactant, whose proportions (3.5:5.5:1.0) were optimized to obtain a Smix with the same HLB of the (CCT-oil) phase. Furthermore, by following this procedure it is possible to obtain small droplets contributing to increase the colloid stability [53].

Phase diagrams can be employed to investigate the phase behavior of emulsion systems, aiming to select translucent systems from other present structures [16,54]. However, they did not assure the stability of such systems, requiring further tests [7]. In this study, the selection of the proportion of multi components, namely, oil, water phase and Smix were attained through ternary diagrams. The diagram displaying regions with different levels of stability by changing the proportion of multi components, is in agreement with data from literature [20,55]. This procedure allowed the preselection of samples with nanoemulsion characteristics that were further characterized.

After definition of formulations with NE characteristics, the physicochemical stability of samples can be obtained through rheological analyses, such as information about the structure of the emulsion and monitoring of the stabilization process [19]. Rheological properties of colloidal suspensions depend on its type, shape, density and number of components, as well as the interaction among them [16]. Thus, microstructure changes influence the system rheology [56]. As for instance, liquid and translucent emulsions generally exhibit Newtonian behavior with constant viscosity for a wide range of shear rate [56,57]. In this report, the prepared formulations displayed Newtonian profile, adequate for oral and

parenteral administration routes [58]. Note that, these routes are suitable to immunomodulators agents. Further, these formulations displayed constant viscosity in a large range of temperature and shear rate.

The synthesized NEs present polydispersity in the range of 0.2 and 0.4, with a reduction of size for samples loading IFN- γ . This observed reduction of polydispersity index is characteristic of NE preparation processes, once it depends on the type of agitation and mixing, and also on the order that components are added [59]. As for instance, selected nanoemulsions containing interferon, NE1IFN- γ and NE3IFN- γ , has a D_H equal to 205 nm and 183 nm, respectively, while with PDI values of 0.41 and 0.38, respectively, in accordance with literature [19,20,60]. Further, ζ potential was approximately -40 mV, for all prepared samples. In particular both, NE1IFN- γ and NE3IFN- γ , present a $\zeta = -36$ mV. These high values attained for ζ potential indicate the ionic characteristic of dispersions, preventing coalescence and assuring stability [17,61].

Prepared samples were further investigated to probe its stability. As for instance, by centrifuging samples in a wide range of velocity, it is possible to confirm its stability or observe its phase separation [7]. All prepared formulations, with or without interferon, when submitted to centrifugation process, maintained macroscopic stability, with aspect translucent and homogeneity during the studied window time. This behavior is characteristic of nanostructured systems [62]. Moreover, interferon loaded synthesized samples passed through stability tests as a function of temperature, namely heating-cooling temperature cycles, remaining translucent and homogeneous. Further, only small variations of pH values and electrical conductivity was observed after thermal stress treatments, indicating that prepared NEs are stable [7,63]. Note that, formulations are biocompatible, once physiologic pH is in the range from 6.0 to 7.0 [64]. In addition, negligible variations in the conductivity values did

not affect the droplet diameter values, suggesting NEs are stable [20], despite the relationship between conductivity changes and instability in NEs being not linear [20,65].

The long term stability presented by the synthesized NEs is mainly due to the reduced size, Brownian motion, and low interfacial tension [52,66]. In particular, selected NEs, containing IFN- γ , presented Newtonian profile and no change in the hysteresis area, during the time interval investigated. Further, NE1IFN- γ showed similar viscosity values during 90 days, while NE13FN- γ had a small decrease. In addition, NE1IFN- γ had its hydrodynamic size increased during the tests, and the dosage of IFN- γ , decreased under performed thermal treatments. Therefore, our findings indicate that NE1IFN- γ formulation presented the highest stability parameters and was selected to perform biological assays.

Toxicity testing is mandatory for development of new formulations [67]. In this context, viability assays of MN cells performed in control (PBS), IFN- γ (IFN- γ in PBS), NE1, and NE1IFN- γ , show that the latter presented higher cell viability than the others groups, even the control ones, during the studied window time. Further, MN cells play an important role in the defense system, by producing NADPH oxidase, anion release, and are able to phagocyte and eliminate bacteria [68], indispensable tasks for successfully immunologic and inflammatory response [69]. Our findings indicate that the optimized nano formulation containing interferon (NE1IFN- γ) is proper to perform biological assays to probe its action regarding the immunologic system. Some studies on nanostructured systems designed to stimulate the phagocytose and microbicidal activity are found in literature but none carrying interferon [70-74]. As for instance, nano-systems containing hormones such as cortisol [71,75], and melatonin [73,76,77], nano fractions of *Momordica charantia* [70], and propolis [74], exhibit properties able to stimulate phagocytosis. The interaction between nanosystems and blood cells is very important, once recognizing and/or delivering the drug depends on the DDS composition and size [78,79]. In addition, drug characteristics and its interaction with the nanosystem influence directly the functional activity of phagocytes.

Cytokines, such as IFN- γ , firstly act on phagocytes by activating its phagocytic and microbicidal activities [29,80]. In this report, biological assays carried out in NE incorporating IFN- γ , show modulation effects on the functional activity of human blood MN phagocytes. Note that similar results for phagocytosis were found when IFN- γ was mixed with cells, but the microbicidal activity was lower [46].

The mechanism of action of cytokines can be associate to several processes such as changes in the Ca²⁺ intracellular release by phagocytes [81]. Further, superoxide release, phagocytosis, and microbicidal activity, associated to Ca²⁺ intracellular release by phagocytes, contribute effectively to the defense system in case of bacterial [50,82] or fungal infections [83], or diseases due to protozoa [77]. In addition, the Ca²⁺ ion plays an important role in the regulation of several biological processes. As for instance, an increase in the intracellular Ca²⁺ influences the liberation of neurotransmitters and cellular membranes excitation [84]. Our findings show an increase in the intracellular Ca²⁺ release in the optimized formulation, when compared with control groups.

The free radical release is an important mechanism of defense during infectious processes, mainly in intestinal infections [49,50,77]. It is known that cells are able to produce great amounts of superoxide radicals during an oxidative stress, but this process can be further stimulated by endogenous or exogenous compounds [85,86], such as melatonin [87,88] and active plants [82,89], and cytokines, such as IFN- γ [46,90] respectively. Here, our findings show that NE1IFN- γ formulation is able to stimulate the functional activity of human blood MN phagocytes by increasing superoxide release, and this increase reflects in phagocytosis and Ca²⁺ intracellular release. Our findings clearly suggest that nanocarriers can magnify the action of IFN- γ on blood cells.

5. CONCLUSION

In the present study, a stable oil-in-water nanoemulsion system containing nano doses of IFN- γ was designed and produced. Our findings indicate that the IFN- γ loaded nanoemulsion, herein developed, acts by improving the immune system. This is shown by the increase of anion superoxide release, phagocytosis, and intracellular Ca²⁺ release in phagocytes of human blood. Further, the prepared formulation displayed Newtonian profile, adequate for oral and parenteral administration routes. Considering the effects of IFN- γ therapies, our modified release system of cytokine is highly promising in the development of immunological therapies, opening new perspectives to improve the efficiency of IFN- γ in the treatment of diseases and infections, parasitic and cancer diseases that promote an immunosuppression.

LIST OF ABBREVIATIONS

AQ	=	aqueous phase
CCT	=	capric/caprylic acid triglycerides
DDS	=	drug delivery systems
DLS	=	dynamic light scattering
EDTA	=	ethylenediaminetetraacetic acid
EPEC	=	enteropathogenic <i>Escherichia coli</i>
GE	=	gelling emulsion
HLB	=	hydrophilic-lipophilic balance
IFN- α and IFN- β	=	type I interferon
IFN- γ	=	type II or γ -interferon
LE	=	liquid emulsion
MN	=	blood mononuclear cells
N	=	normal
NE1 to NE9	=	NE formulations
NE1IFN- γ	=	formulations nanoemulsion interferon- γ
NEs	=	nanoemulsions
NK cells	=	natural killer cells
O/W or W/O	=	oil-in-water or water-in-oil
PBS	=	phosphate buffered saline

PDI	=	polydispersity index
PG	=	propylene glycol
PS	=	phase separation
SP	=	sorbitan oleate, Span 80 [®]
T cells	=	thymus-derived cells
TW	=	polysorbate 80, Tween 80 [®]
ζ	=	Zeta potential

CONFLICT OF INTEREST

The authors confirm that this article content has no conflict of interest.

ACKNOWLEDGEMENTS

The financial support from the Brazilian agencies MCTI-CNPq, FINEP, FAPEMAT/MT, FAP/DF, and CAPES is gratefully acknowledged.

REFERENCES

- Onoue, S.; Yamada, S.; Chan, H.K. Nanodrugs: Pharmacokinetics and Safety. *Int. J. Nanomedicine*, **2014**, *9*, 1025-1037.
- Gianella, A.; Jarzyna, P.a.; Mani, V.; Ramachandran, S.; Calcagno, C.; Tang, J.; Kann, B.; Dijk, W.J.R.; Thijssen, V.L.; Griffioen, A.W.; Storm, G.; Fayad, Z.a.; Mulder, W.J.M. Multifunctional Nanoemulsion Platform for Imaging Guided Therapy Evaluated in Experimental Cancer. *ACS Nano*, **2011**, *5*(6), 4422-4433.
- Mora-Huertas, C.E.; Fessi, H.; Elaissari, A. Polymer-Based Nanocapsules for Drug Delivery. *Int. J. Pharm.*, **2010**, *385*(1-2), 113-142.
- Hu, S.; Tsai, C.; Liao, C.; Liu, D.; Chen, S. Controlled Rupture of Magnetic Polyelectrolyte Microcapsules for Drug Delivery. *Langmuir*, **2008**, *24*(29), 11811-11818.
- Kopeček, J. Polymer-Drug Conjugates: Origins, Progress to Date and Future Directions. *Adv. Drug Deliv. Rev.*, **2013**, *65*(1), 49-59.
- Allen, T.M.; Cullis, P.R. Liposomal Drug Delivery Systems: From Concept to Clinical Applications. *Adv. Drug Deliv. Rev.*, **2013**, *65*(1), 36-48.
- Ribeiro, E.B.; Kelly, P.; Lanes, D.; Galdeano, N.; Chaud, A.; Pessoa, R.S.; Honorio-França, A.C.; França, E.L. Microemulsions with Levamisole Delivery Systems as Novel Immunomodulating Agents with Potential for Amebiasis Therapies. *Sci. Adv. Mater.*, **2015**, *7*, 15-27.
- Donsi, F.; Annunziata, M.; Vincenzi, M.; Ferrari, G. Design of Nanoemulsion-Based Delivery Systems of Natural Antimicrobials: Effect of the Emulsifier. *J. Biotechnol.*, **2012**, *159*(4), 342-350.
- Soler, M.A.G.; Lima, E.C.D.; Nunes, E.S.; Silva, F.L.R.; Oliveira, A.C.; Azevedo, R.B.; Morais, P.C. Spectroscopic Study of Maghemite Nanoparticles Surface-Grafted with DMSA. *J. Phys. Chem. A*, **2011**, *115*(6), 1003-1008.
- Py-daniel, K.R.; Namban, J.S.; Andrade, L.R. De; Souza, P.E.N.De; Paterno, L.G.; Azevedo, R. B.; Soler, M. A. G. Highly Efficient Photodynamic Therapy Colloidal System Based on Chloroaluminum Phthalocyanine / Pluronic Micelles. *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, **2016**, *103*, 23-31.
- Borhade, V.; Pathak, S.; Sharma, S.; Patravale, V. Clotrimazole Nanoemulsion for Malaria Chemotherapy. Part I: Preformulation Studies, Formulation Design and Physicochemical Evaluation. *Int. J. Pharm.*, **2012**, *431*(1-2), 138-148.
- Silva, H.D.; Cerqueira, M.A.; Souza, B.W.S.; Ribeiro, C.; Avides, M.C.; Quintas, M.A.C.; Coimbra, J.S.R.; Carneiro-Da-Cunha, M.G.; Vicente, A.a. Nanoemulsions of β-Carotene Using a High-Energy Emulsification- Evaporation Technique. *J. Food Eng.*, **2011**, *102*, 130-135.
- Ozturk, B.; Argin, S.; Ozilgen, M.; McClements, D.J. Formation and Stabilization of Nanoemulsion-Based Vitamin E Delivery Systems Using Natural Surfactants: Quillaja Saponin and Lecithin. *J. Food Eng.*, **2014**, *142*, 57-63.
- Li, X.; Qi, J.; Xie, Y.; Zhang, X.; Hu, S.; Xu, Y.; Lu, Y.; Wu, W. Nanoemulsions Coated with Alginate/chitosan as Oral Insulin Delivery Systems: Preparation, Characterization, and Hypoglycemic Effect in Rats. *Int. J. Nanomedicine*, **2012**, *8*, 23-32.
- McClements, D.J. Nanoemulsions versus Microemulsions: Terminology, Differences, and Similarities. *Soft Matter*, **2012**, *8*, 1719.
- Fryd, M.M.; Mason, T.G. Advanced Nanoemulsions. *Annu. Rev. Phys. Chem.*, **2012**, *63*, 493-518.
- Lawrence, M.J.; Rees, G.D. Microemulsion-Based Media as Novel Drug Delivery Systems. *Adv. Drug Deliv. Rev.*, **2012**, *64*, 175-193.
- Bonifacio, B.V.; Silva, P.B. da; Ramos, M.A. dos S.; Negri, K.M.S.; Chorilli, M. Nanotechnology-Based Drug Delivery Systems and Herbal Medicines: A Review. *Int. J. Nanomedicine*, **2014**, *9*, 1-15.
- Chime, S.A.; Kenekukwu, F.C.; Attama, A.A. Nanoemulsions - Advances in Formulation , Characterization and Applications in Drug Delivery. In: *Application of Nanotechnology in Drug Delivery*, **2014**, pp. 77-126.
- Bernardi, D.S.; Pereira, T.a; Maciel, N.R.; Bortoloto, J.; Viera, G.S.; Oliveira, G.C.; Rocha-Filho, P.a. Formation and Stability of Oil-in-Water Nanoemulsions Containing Rice Bran Oil: In Vitro and in Vivo Assessments. *J. Nanobiotechnology*, **2011**, *9*(1), 2-9.
- Gutiérrez, J.M.; González, C.; Maestro, A.; Solè, I.; Pey, C.M.; Nolla, J. Nano-Emulsions: New Applications and Optimization of Their Preparation. *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.*, **2008**, *13*, 245-251.
- Barratt, G. Therapeutic Applications of Colloidal Drug Carriers. *Pharm. Sci. Technol. Today*, **2000**, *3*(5), 163-171.
- Christian, D.A.; Hunter, C.A. Particle-Mediated Delivery of Cytokines for Immunotherapy. *Immunotherapy*, **2013**, *4*(4), 425-441.
- Hao, X.; Zhu, Y.; Zheng, C.; Fu, X.; Feng, J.; Shen, B. A Comparison of Biological Activity of B Lymphocyte Stimulator (BLYS) Antagonist Peptidobodies and the Elucidation of Possible BLYS Binding Sites. *Protein Pept. Lett.*, **2016**, *23*, 17-23.
- Sajan, J.; Cinu, T.A.; Chacko, A.J.; Litty, J.; Jaseeda, T. Chronotherapeutics and Chronotherapeutic Drug Delivery Systems. *Trop. J. Pharm. Res.*, **2009**, *8*(5), 467-475.
- Mandal, A.S.; Biswas, N.; Karim, K.M.; Guha, A.; Chatterjee, S.; Behera, M.; Kuotsu, K. Drug Delivery System Based on Chronobiology-A Review. *J. Control. Release*, **2010**, *147*(3), 314-325.
- Khan, T.A.; Reddy, S.T. Immunological Principles Regulating Immunomodulation with Biomaterials. *Acta Biomater.*, **2014**, *10*(4), 1720-1727.
- Riet, V.E.; Hartgers, F.C.; Yazdanbakhsh, M. Chronic Helminth Infections Induce Immunomodulation: Consequences and Mechanisms. *Immunobiology*, **2007**, *212*(6), 475-490.
- Pessoa, R.S.; França, E.L.; Ribeiro, E.B.; Abud, N.G.; Honorio-, A.C. Microemulsion of Babassu Oil as a Natural Product to Improve Human Immune System Function. *Drug Des. Devel. Ther.*, **2014**, *9*, 21-31.
- Purwada, A.; Roy, K.; Singh, A. Engineering Vaccines and Niches for Immune Modulation. *Acta Biomater.*, **2014**, *10*, 1728-1740.
- Van Slooten, M.L.; Hayon, I.; Babai, I.; Zakay-Rones, Z.; Wagner, E.; Storm, G.; Kedar, E. Immunoadjuvant Activity of Interferon-γ-Liposomes Co-Administered with Influenza Vaccines. *Biochim. Biophys. Acta*, **2001**, *1531*, 99-110.
- Karau, C.; Oetszulat, M.; Shmidt, P.C. Preparation and Stability of Interferon-α-Containing Liposomes. *Int. J. Pharm.*, **1996**, *128*, 89-98.
- Van Slooten, M.L.; Boerman, O.; Romøren, K.; Kedar, E.; Crommelin, D.J.; Storm, G. Liposomes as Sustained Release System for Human Interferon-γ: Biopharmaceutical Aspects. *Biochim. Biophys. Acta*, **2001**, *1530*, 134-145.
- Slooten, M.L. Van; Storm, G.; Zoepfel, A.; Ku, Z.; Wagner, E.; Kircheis, R. Liposomes Containing Interferon-γ as Adjuvant in Tumor Cell Vaccines. *Pharm. Res.*, **2000**, *17*(1), 42-48.
- Sanchez, A.; Tobio, M.; Gonzales, L.; Fabra, A.; Alonso, M.J.B. Iodegradable Micro- and Nanoparticles as Long-Term Delivery Vehicles for. *Eur. J. Pharm. Sci.*, **2003**, *18*, 221-229.
- Fatemeh, S.; Rahjerdi, A.K.; Amani, J.; Rad, I.; Jafari, M. Designing and Structure Evaluation of Multi-Epitope Vaccine Against ETEC and EHEC: An In Silico Approach. *Protein Pept. Lett.*, **2016**, *23*, 33-42.
- Boehm, U.; Klamp, T.; Groot, M.; Howard, J.C. Cellular Responses to Interferon-γ. *Annu. Rev. Immunol.*, **1997**, *15*, 749-795.

- [38] Dunn, G.P.; Koebel, C.M.; Schreiber, R.D. Interferons, Immunity and Cancer Immunoeediting. *Nat. Rev. Immunol.*, **2006**, *6*, 836-848.
- [39] Gessani, S.; Belardelli, F. IFN-Gamma Expression in Macrophages and Its Possible Biological Significance. *Cytokine Growth Factor Rev.*, **1998**, *9*(2), 117-123.
- [40] Billiau, A.; Matthys, P. Interferon-Y: A Historical Perspective. *Cytokine Growth Factor Rev.*, **2009**, *20*(2), 97-113.
- [41] Ealick, S.E.; Cook, W.J.; Vijay-Kumar, S.; Carson, M.; Nagabhushan, T.L.; Trotta, P.P.; Bugg, C.E. Three-Dimensional Structure of Recombinant Human Interferon-Gamma. *Science*, **1991**, *252*, 698-702.
- [42] Farrar, M.A.; Schreiber, R.D. The Molecular Cell Biology of Interferon-Gamma and Its Receptor. *Annu. Rev. Immunol.*, **1993**, *11*, 571-611.
- [43] Su, X.; Yu, Y.; Zhong, Y.; Giannopoulou, E.G.; Hu, X.; Liu, H.; Cross, J.R.; Rättsch, G.; Rice, C.M.; Ivashkiv, L.B. Interferon- γ Regulates Cellular Metabolism and mRNA Translation to Potentiate Macrophage Activation. *Nat. Immunol.*, **2015**, *16*(8), 838-851.
- [44] Honorio-frança, A.C.; Morais, T.C.; Silva, R.R. Immunomodulation by Cytokines in Chronobiological Vision. *World J. Pharm. Res.*, **2013**, *2*(5), 1325-1345.
- [45] Sanchez-Muñoz, F. Role of Cytokines in Inflammatory Bowel Disease. *World J. Gastroenterol.*, **2008**, *14*(27), 4280.
- [46] Fagundes, D.L.G.; França, E.L.; Morceli, G.; Vieira, M.; Rudge, C.; Mattos, I.De; Calderon, P.; Honorio-frança, A.C. The Role of Cytokines in the Functional Activity of Phagocytes in Blood and Colostrum of Diabetic Mothers. *Clin. Dev. Immunol.*, **2013**, *2013*, 1-8.
- [47] Guan, Y.; Zheng, Z.; Li, Z.; Liu, J. Cell Death in HeLa Mediated by Thermoplastic Polyurethane with Co-Immobilized IFN-G plus TNF- α . *Acta Biomater.*, **2012**, *8*(3), 1348-1356.
- [48] França, E.L.; Ribeiro, E.B.; Scherer, E.F.; Cantarini, D.G.; Pessôa, R.S.; França, F.L.; Honorio-frança, A.C. Effects of Momordica Charantia L. on the Blood Rheological Properties in Diabetic Patients. *Biomed Res. Int.*, **2014**, *2014*(840379), 1-8.
- [49] Honorio-frança, A.C.; Carvalho, M.P.S.M.; Isaac, L.; Trabulsi, L.R.; Carneiro-Sampaio, M.M.S. Colostral Mononuclear Phagocytes Are Able to Kill Enteropathogenic Escherichia Coli Opsonized with Colostral IgA. *Scand. J. Immunol.*, **1997**, *46*, 59-66.
- [50] França, E.L.; Morceli, G.; Fagundes, D.L.G.; Rudge, M.V.C.; Calderon, I.de M.P.; Honorio-França, A.C. Secretory IgA-Fc α Receptor Interaction Modulating Phagocytosis and Microbicidal Activity by Phagocytes in Human Colostrum of Diabetics. *Apmis*, **2011**, *2*, 710-719.
- [51] Kabri, T.; Arab-Tehrany, E.; Belhaj, N.; Linder, M. Physico-Chemical Characterization of Nano-Emulsions in Cosmetic Matrix Enriched on Omega-3. *J. Nanobiotechnol.*, **2011**, *9*(1), 1-8.
- [52] Fernandes, caio P.; Almeida, F.B. de; Silveira, A.N.; Gonzalez, M.S.; Mello, C.B.; Feder, D.; Apolinário, R.; Santos, M.G.; Carvalho, J.C.T.; Tietbohl, L.A.C.; Falcão, D.Q. Development of an Insecticidal Nanoemulsion with Manilkara Subsericea (Sapotaceae) Extract. *J. Nanobiotechnol.*, **2014**, *12*, 1-9.
- [53] Housaindokht, M.R.; Pour, A.N. Study the Effect of HLB of Surfactant on Particle Size Distribution of Hematite Nanoparticles Prepared via the Reverse Microemulsion. *Solid State Sci.*, **2012**, *14*(5), 622-625.
- [54] Abofazeli, R.; Patel, N.; Thomas, M.; Lawrence, M.J. Investigations into the Formation and Characterization of Phospholipid Microemulsions. IV. Pseudo-Ternary Phase Diagrams of Systems Containing Water-Lecithin-Alcohol and Oil; the Influence of Oil. *Int. J. Pharm.*, **1995**, *125*, 107-116.
- [55] Peng, L.C.; Liu, C.H.; Kwan, C.C.; Huang, K.F. Optimization of Water-in-Oil Nanoemulsions by Mixed Surfactants. *Colloids Surf. A Physicochem. Eng. Asp.*, **2010**, *370*(1-3), 136-142.
- [56] Acharya, D.P.; Hartley, P.G. Progress in Microemulsion Characterization. *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.*, **2012**, *17*(5), 274-280.
- [57] Rojas, O.; Koetz, J.; Kosmella, S.; Tiersch, B.; Wacker, P.; Kramer, M. Structural Studies of Ionic Liquid-Modified Microemulsions. *J. Colloid Interface Sci.*, **2009**, *333*(2), 782-790.
- [58] Sharma, G.; Wilson, K.; Walle, C.F. Van Der; Sattar, N.; Petrie, J.R.; Kumar, M.N.V.R. Microemulsions for Oral Delivery of Insulin: Design, Development and Evaluation in Streptozotocin Induced Diabetic Rats. *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, **2010**, *76*(2), 159-169.
- [59] Ghosh, V.; Saranya, S.; Mukherjee, A.; Chandrasekaran, N. Antibacterial Microemulsion Prevents Sepsis and Triggers Healing of Wound in Wistar Rats. *Colloids Surf. B Biointerfaces*, **2013**, *105*, 152-157.
- [60] Pratap, S.B.; Brajesh, K.; Jain, S.K.; Kausar, S. Development and Characterization of A Nanoemulsion Gel Formulation for Transdermal Delivery of Carvedilol. *Int. J. Drug Dev. Res.*, **2012**, *4*(1), 151-161.
- [61] Honary, S.; Zahir, F. Effect of Zeta Potential on the Properties of Nano-Drug Delivery Systems - A Review (Part 1). *Trop. J. Pharm. Res.*, **2013**, *12*, 255-264.
- [62] Tadros, T.; Izquierdo, P.; Esquena, J.; Solans, C. Formation and Stability of Nano-Emulsions. *Adv. Colloid Interface Sci.*, **2004**, *108-109*, 303-318.
- [63] Martin, A.N.; Sinko, P.J.; Singh, Y. *Physical Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 6th ed.; Troy, D. B., Ed.; Wolters Kluwer: Philadelphia, **2011**.
- [64] Ansari, S.A. Skin pH and Skin Flora. In *Handbook of cosmetic science and technology*; Healthcare, I., Ed.; New York, 2009; pp. 221-232.
- [65] Masmoudi, H.; Dréau, Y. Le; Piccerelle, P.; Kister, J. The Evaluation of Cosmetic and Pharmaceutical Emulsions Aging Process Using Classical Techniques and a New Method: FTIR. *Int. J. Pharm.*, **2005**, *289*, 117-131.
- [66] Solans, C.; Izquierdo, P.; Nolla, J.; Azemar, N.; Garcia-Celma, M.J. Nano-Emulsions. *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.*, **2005**, *10*, 102-110.
- [67] Nel, A.; Xia, T.; Mädler, L.; Li, N. Toxic Potential of Materials at the Nanolevel. *Science*, **2006**, *311*(006), 622-627.
- [68] Djaldetti, M.; Salman, H.; Bergman, M.; Djaldetti, R. Phagocytosis - The Mighty Weapon of The Silent Warriors. *Microsc. Res. Tech.*, **2002**, *431*, 421-431.
- [69] Dizdaroglu, M.; Jaruga, P.; Mustafa, B.; Rodriguez, H. Free Radical-Induced Damage to DNA: Mechanisms and Measurement. *Free Radic. Biol. Med.*, **2002**, *32*(11), 1102-1115.
- [70] Scherer, E.F.; Honorio-França, A.C.; Hara, C.C.P. de; Reinaque, A. P.B.; Côrtes, M.A.; França, E.L. Immunomodulatory Effects of Poly(ethylene Glycol) Microspheres Adsorbed with Nanofractions of Momordica Charantia L. on Diabetic Human Blood Phagocytes. *Sci. Adv. Mater.*, **2011**, *3*(5), 687-694.
- [71] Fagundes, D.L.G.; França, E.L.; Hara, C. de C.P.; Honorio-França, A.C. Immunomodulatory Effects of Poly (Ethylene Glycol) Microspheres Adsorbed with Cortisol on Activity of Colostrum Phagocytes. *Int. J. Pharmacol.*, **2012**, *8*(6), 510-518.
- [72] Reinaque, A.P.B.; França, E.L.; Scherer, E.F.; Côrtes, M.A.; Souto, F.J.D.; Honorio-França, A.C. Natural Material Adsorbed onto a Polymer to Enhance Immune Function. *Drug Des. Devel. Ther.*, **2012**, *6*, 209-216.
- [73] Hara, C. de C.P.; Honorio-França, A.C.; Fagundes, D.L.G.; Guimarães, P.C.L.; França, E.L. Melatonin Nanoparticles Adsorbed to Polyethylene Glycol Microspheres as Activators of Human Colostrum Macrophages. *J. Nanomater.*, **2013**, *2*, 1-8.
- [74] Possamai, M.M.; Honorio-França, A.C.; Reinaque, A.P.B.; França, E.L.; Souto, P.C.de S. Brazilian Propolis: A Natural Product That Improved the Fungicidal Activity by Blood Phagocytes. *J. Biomed. Biotechnol.*, **2013**, *2013*, 1-9.
- [75] Rassias, A.J.; Marrin, C.A.S.; Arruda, J.; Whalen, P.K.; Beach, M.; Yeager, M.P. Insulin Infusion Improves Neutrophil Function in Diabetic Cardiac Surgery Patients. *Anesth. Analg.*, **1999**, *88*, 1011-1016.
- [76] França, E.L.; Feliciano, N.D.; Silva, K.A.; Kusano, C.; Ferrari, B.; Honorio-frança, A.C. Modulatory Role of Melatonin on Superoxide Release by Spleen Macrophages Isolated from Alloxan-Induced Diabetic Rats. *Bratislava Med. J.*, **2009**, *110*(9), 517-522.
- [77] França-Botelho, A.C.; França, J.L.; Oliveira, F.M.S.; Franca, E.L.; Honorio-França, A.C.; Caliani, M.V.; Gomes, M.a. Melatonin Reduces the Severity of Experimental Amoebiasis. *Parasit. Vectors*, **2011**, *4*(1), 62.
- [78] Santana, J.F.B.; Soler, M.A.G.; da Silva, S.W.; Guedes, M.H.; Lacava, Z.G.M.; Azevedo, R.B.; Morais, P.C. Investigation of the Interaction between Magnetic Nanoparticles Surface-Coated with Carboxymethyl-dextran and Blood Cells Using Raman Spectroscopy. *J. Magn. Magn. Mater.*, **2005**, *289*, 452-454.
- [79] Soler, M.A.G.; Bão, S.N.; Alcântara, G.B.; Tibúrcio, V.H.S.; Paludo, G.R.; Santana, J.F.B.; Guedes, M.H.; Lima, E.C.D.; Lacava, Z.G.M.; Morais, P.C. Interaction of Erythrocytes with Magnetic Nanoparticles. *J. Nanosci. Nanotechnol.*, **2007**, *7*(3), 1069-1071.

- [80] Saito, S.; Sakai, M. Th1/Th2 Balance in Preeclampsia. *J. Reprod. Immunol.*, **2003**, *59*, 161-173.
- [81] Collison, K.S.; Parhar, R.S.; Saleh, S.S.; Meyer, B.F.; Kwaasi, A.A.; Hammami, M.M.; Schmidt, A.M.; Stern, D.M.; Al-mohanna, F. A. RAGE-Mediated Neutrophil Dysfunction Is Evoked by Advanced Glycation End Products (AGEs). *J. Leukoc. Biol.*, **2002**, *71*, 433-444.
- [82] França, E.L.; Maynié, J.C.; Correa, V.C.; Correia, U.; Pereira, R.; Batalini, C.; Kusano, C.; Ferrari, B. Immunomodulatory Effects of Herbal Plants plus Melatonin on Human Blood Phagocytes. *Int. J. Phytomedicine*, **2010**, *2*, 354-362.
- [83] Kuhlwein, E.; Irwin, M. Melatonin Modulation of Lymphocyte Proliferation and Th1 R Th2 Cytokine Expression. *J. Neuroimmunol.*, **2001**, *117*, 51-57.
- [84] Prado, W.A. Involvement of Calcium in Pain and Antinociception. *Brazilian J. Med. Biol. Res.*, **2001**, *34*, 449-461.
- [85] Nascimento, R.F.; Barroqueiro, E.S.B.; Paula, A.; Azevedo, S.; Lopes, A.S.; Ferreira, S.C.P.; Silva, L.A.; Maciel, C.G.; Rodriguez, D.; Guerra, R.N.M. Macrophage Activation Induced by Orbignya Phalerata Mart. *J. Ethnopharmacol.*, **2006**, *103*(1), 53-58.
- [86] Robertson, R.P. Chronic Oxidative Stress as a Central Mechanism for Glucose Toxicity in Pancreatic Islet Beta Cells in Diabetes. *J. Biol. Chem.*, **2004**, *279*(41), 42351-42354.
- [87] Honorio-frança, A.C.; Hara, C. de C.P.; Ormonde, J.V.S.; Nunes, G.T.; França, E.L. Human Colostrum Melatonin Exhibits a Day-Night Variation and Modulates the Activity of Colostral Phagocytes. *J. Appl. Biomed.*, **2013**, *11*, 153-162.
- [88] Pawlak, J.; Singh, J.; Lea, R.W.; Skwarlo-Sonta, K. Effect of Melatonin on Phagocytic Activity and Intracellular Free Calcium Concentration in Testicular Macrophages from Normal and Streptozotocin-Induced Diabetic Rats. *Mol. Cell. Biochem.*, **2005**, *275*(1-2), 207-213.
- [89] França, E.L.; Fagundes, D.L.G.; Leão, L.D.; Honorio-frança, A.C. Efeito Do Composto "mais Vida" Na Ativação de Macrófagos de Ratos Diabéticos. *Rev. Bras. Plantas Med.*, **2012**, *14*(1), 1-7.
- [90] Moraes, L.C.A.; França, E.L.; Pessoa, R.S.; Fagundes, D.L.G.; Hernandez, M.G.; Ribeiro, V.P.; Gomes, M.A.; Honorio-França, A.C. The Effect of IFN- γ and TGF- β in the Functional Activity of Mononuclear Cells in the Presence of Entamoeba Histolytica. *Parasit. Vectors*, **2015**, *8*(1), 413.