

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
FACULDADE DE FARMÁCIA

Karina Silva Bambini

INCORPORAÇÃO DE EXTRATOS DE *Achyrocline satureioides* EM  
NANOEMULSÕES PRÉ-FORMADAS: ESTUDO DE FORMULAÇÃO

Porto Alegre

2013

Karina Silva Bambini

INCORPORAÇÃO DE EXTRATOS DE *Achyrocline satureioides* EM  
NANOEMULSÕES PRÉ-FORMADAS: ESTUDO DE FORMULAÇÃO

Trabalho de Conclusão de Curso  
apresentado à Faculdade de  
Farmácia/UFRGS como requisito  
parcial para a obtenção do título de  
Farmacêutica.

Orientador: Prof. Dr. Helder Ferreira Teixeira

Co-orientadora: Dra. Juliana Bidone

Porto Alegre

2013

Este artigo foi elaborado segundo as normas da revista (*Latin American Journal of Pharmacy*) apresentadas em anexo.

Incorporação de extratos de *Achyrocline satureioides* em nanoemulsões pré-formadas:  
estudo de formulação

Karina S. Bambini<sup>1</sup>, Juliana Bidone<sup>2</sup>, Helder F. Teixeira\* <sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Curso de Farmácia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul

<sup>2</sup>Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Av. Ipiranga 2752, 90610-000 Porto Alegre, Brasil.

\*Autor para correspondência. E-mail: [helder.teixeira@ufrgs.br](mailto:helder.teixeira@ufrgs.br) (H.F. Teixeira)

## RESUMO

Nanoemulsões têm sido avaliadas na melhora das características físico-químicas de fármacos e ativos com reduzida hidrossolubilidade, com intuito de facilitar a sua incorporação em formas farmacêuticas e aumentar a resposta biológica. Existem dois métodos principais para a incorporação de compostos em nanoemulsões: adição extemporânea ou incorporação na fase orgânica. A adição extemporânea dos compostos em sistemas pré-formados tem sido amplamente utilizada em pequenos estabelecimentos para desenvolvimento de produtos farmacêuticos e cosméticos. No entanto, a eficiência de incorporação e a reprodutibilidade desta técnica têm sido esparsamente avaliadas. Sendo assim, neste trabalho, nanoemulsões contendo extrato hidroetanólico (HE), liofilizado (LIO) e nebulizado (NEB) das inflorescências de *Achyrocline satureioides* (marcela), em diferentes concentrações, foram preparadas pela técnica de adição extemporânea em sistemas pré-formados. Independente do tipo de extrato utilizado, as propriedades físico-químicas das nanoemulsões permaneceram inalteradas até a concentração de 0,25% de resíduo seco. Quantidades superiores de HE conduzem a uma desestabilização da formulação. Em relação aos extratos secos, quantidades superiores foram incorporadas às nanoemulsões. Os flavonóides quercetina, luteolina e 3-O-metilquercetina da marcela foram satisfatoriamente incorporados em nanoemulsões após adição de extrato liofilizado. As nanoemulsões contendo extrato nebulizado, por sua vez, foram bastante estáveis e demonstraram características de tamanho médio de gotícula, índice de polidispersão e potencial- $\zeta$  adequados, embora a presença do dióxido de silício coloidal tenha conduzido à redução do teor de flavonóides nestas formulações. A avaliação da liberação da 3-O-metilquercetina a partir das formulações contendo 0,25% de extrato hidroetanólico, liofilizado ou nebulizado seguiu uma cinética de primeira ordem, alcançando 40% de liberação após oito horas. A liberação do flavonóide a partir das formulações contendo 1% de extrato alcançou 70%, com cinética dependente do tipo de extrato incorporado.

Palavras-chave: nanoemulsões pré-formadas, *A. satureioides*, liberação

## INTRODUÇÃO

A incorporação de moléculas de reduzida hidrossolubilidade em formulações farmacêuticas é complexa. Com isso, a busca por novos sistemas de liberação capazes de veicular tais fármacos e ativos foi foco de muitos estudos nas últimas décadas<sup>1,2</sup>. Neste sentido, as nanoestruturas têm mostrado promissora capacidade de aumentar a solubilidade, modular a liberação, melhorar a biodisponibilidade e aumentar a estabilidade de inúmeras moléculas, especialmente de baixa hidrossolubilidade. As nanoemulsões, de modo particular, são dispersões de gotículas oleosas em uma fase externa aquosa, estabilizadas por tensoativos, capazes de veicular diferentes compostos dispersos em seu núcleo oleoso ou adsorvidos na interface<sup>1,3</sup>. O tamanho e a distribuição de tamanho das gotículas são dependentes da composição qualitativa e quantitativa e do método de preparação, mas de modo geral encontram-se na faixa de 100 a 500 nm<sup>4</sup>.

A utilização de nanoemulsões em formulações destinadas ao uso tópico possui inúmeras vantagens. Além de serem mais estáveis quando comparadas às emulsões clássicas, apresentam boa espalhabilidade e facilitam a penetração de ativos na pele. As nanoemulsões também possuem a capacidade de formar filme na superfície da pele, o que está relacionado com o reduzido tamanho das gotículas. A formação deste filme resulta em menor perda de água transepidérmica e, conseqüentemente, promove a hidratação da pele. Quanto maior a homogeneidade das populações de gotículas, mais eficiente será a formação do filme<sup>5</sup>. Com relação à composição do núcleo oleoso e interface das nanoemulsões, de modo geral, são preferíveis compostos biocompatíveis ou de reduzida toxicidade. Os óleos mais amplamente utilizados são os de origem vegetal, como os triglicerídeos de cadeia média ou triglicerídeos de cadeia longa, como óleo de soja e óleo de rícino. Para a interface, tensoativos anfotéricos, como as lecitinas, e tensoativos não-iônicos, como os polissorbatos, têm sido os mais utilizados<sup>1,5</sup>.

Na literatura, podem ser encontradas diferentes técnicas descritas para obtenção de nanoemulsões, sendo divididas basicamente em métodos de alta e baixa energia. Os métodos de alta energia incluem microfluidização, homogeneização à alta pressão e sonicação, e necessitam de equipamentos específicos. Embora sejam eficientes na obtenção de emulsões

de tamanho reduzido, apresentam limitações no desenvolvimento de formulações contendo moléculas lábeis ou macromoléculas. Os métodos de baixa energia, por sua vez, são a emulsificação espontânea e as técnicas da temperatura de transição de fases e do ponto de inversão da nanoemulsão<sup>1,6</sup>. Os dois últimos métodos empregam a transição de fases, onde a curvatura do tensoativo é alterada em determinado momento do preparo, em decorrência da mudança da temperatura ou da composição do sistema<sup>7</sup>. A emulsificação espontânea, por sua vez, é amplamente utilizada por ser uma técnica simples, rápida, de baixo custo, reproduzível e por permitir a preparação de pequenos volumes de amostra em baixas temperaturas, evitando a degradação de ativos e dos fosfolípidos<sup>8</sup>. Tecnicamente, esta técnica consiste na solubilização de constituintes da fase interna da emulsão em um solvente orgânico, seguida da adição desta fase em uma fase aquosa sob agitação moderada e constante, com posterior remoção do solvente orgânico. A formação das gotículas da fase interna acontece no momento em que a fase orgânica é vertida sobre a fase aquosa, com deslocamento do solvente orgânico<sup>4,9</sup>. O método de preparo escolhido reflete nas propriedades físico-químicas que apresentarão as nanoemulsões, como na sua estabilidade termodinâmica<sup>6</sup>.

Com relação aos modos de incorporação de moléculas em nanoemulsões, a solubilização dos fármacos/ativos juntamente com os componentes da fase interna é geralmente descrita. Neste caso, os fármacos/ativos estarão solúveis/dispersos no núcleo oleoso e/ou adsorvidos na interface. No entanto, a incorporação na interface pode ser também realizada com a adição do composto ativo de interesse em nanoemulsões pré-formadas<sup>10</sup>. SolEmuls<sup>®</sup> é uma tecnologia patenteada onde uma suspensão de fármaco é combinada com uma nanoemulsão pronta disponível comercialmente, como por exemplo Lipofundin<sup>®</sup>, sendo submetidas a uma vigorosa agitação. Assim, moléculas de solubilidade intermediária são incorporadas na interface da nanoemulsão<sup>11</sup>. Tal tecnologia tem sido avaliada na incorporação de anfotericina B, carbamazepina e itraconazol<sup>11,12,13</sup>. Em termos mais gerais, a adição extemporânea de fármacos/ativos pode ser realizada com ou sem prévia solubilização. No primeiro caso, um solvente orgânico é utilizado para assegurar a solubilização completa do composto, o que torna a técnica limitada em termos de estabilidade, visto que o solvente pode comprometer a integridade do sistema. Já no segundo caso, o ativo é incorporado diretamente na nanoemulsão pré-formada, sob agitação moderada e constante<sup>13,14</sup>.

A técnica da adição extemporânea de fármacos/ativos em nanoemulsões pré-formadas adquiridas de fornecedores é uma prática comum e recorrente em diversos estabelecimentos de manipulação de produtos farmacêuticos e também em pequenas indústrias. Embora útil e de fácil aplicação, esta técnica de incorporação apresenta algumas desvantagens como o possível aparecimento de modificações físicas incluindo cremagem, precipitação e separação de fases após a adição do ativo em estado sólido particulado ou da solução do mesmo<sup>15</sup>. No entanto, são escassos os estudos que avaliam a eficiência de incorporação através desta técnica, especialmente a partir de matrizes complexas como extratos vegetais. O interesse em produtos nanoestruturados contendo frações ou extratos vegetais tem se expandido progressivamente, em ambos os setores farmacêutico e cosmético. Com base nisso, este trabalho buscou avaliar a capacidade de incorporação dos flavonóides quercetina (QCT), luteolina (LUT) e 3-O-metilquercetina (MQ) em nanoemulsões por adição extemporânea de extratos de *Achyrocline satureioides*.

*Achyrocline satureioides* Lam DC - Asteraceae é uma planta amplamente utilizada no Sul da América do Sul, sendo conhecida principalmente como marcela ou macela. Os extratos hidroetanólicos das inflorescências têm demonstrado a maior parte das atividades atribuídas à planta. Atividades como antioxidante, antiinflamatória, fotoprotetora e anti-herpética foram evidenciadas após uso tópico dos extratos hidroetanólicos da marcela, sendo relacionadas principalmente à presença dos flavonóides QCT, LUT e MQ<sup>16,17,18,19,20,21</sup>. No entanto, QCT, LUT e MQ são encontrados na *A. satureioides* preponderantemente na forma de agliconas, que possuem reduzida hidrossolubilidade e limitada capacidade de penetração cutânea<sup>22,23</sup>. Estas características dificultam a utilização dos extratos hidroetanólicos da marcela no tratamento tópico de distúrbios cutâneos. Além disso, a incorporação dos extratos líquido ou secos desta planta em formulações farmacêuticas ou cosméticas é um processo bastante limitado. No entanto, de encontro a estes desafios na utilização de extratos da marcela, tem crescido nos últimos anos o interesse no desenvolvimento de formulações contendo estes extratos, especialmente no setor cosmético de produtos anti-envelhecimento, o que reflete no grande número de novas patentes<sup>24</sup>.

Neste sentido, estudos têm sido realizados a fim de avaliar a incorporação de extratos de *A. satureioides* em nanoestruturas, como lipossomas e nanoemulsões<sup>25,26</sup>. Com as nanoestruturas

buscou-se viabilizar a incorporação dos extratos de marcela em formulações, reduzir a sua toxicidade, modular a penetração cutânea dos flavonóides, bem como melhorar as características sensoriais, como redução do forte odor dos extratos<sup>24</sup>. Os lipossomas apresentam-se adequados à proposta, mas de modo geral possuem as desvantagens de serem obtidos a partir de processos mais complexos e de serem menos estáveis que as nanoemulsões<sup>11,27</sup>. As nanoemulsões obtidas por Bidone (2013), contendo extratos hidroetanólicos (líquido e secos) de *A. satureioides* demonstraram elevada estabilidade. Os extratos foram solubilizados na fase orgânica das nanoemulsões, sendo demonstrada uma elevada capacidade de incorporação do sistema. A utilização do extrato hidroetanólico líquido foi vantajosa, em relação ao extrato seco, por permitir a obtenção de formulações em apenas uma etapa, sem o prévio processo de secagem<sup>26,29</sup>.

No presente trabalho, o método utilizado para incorporação dos extratos da marcela foi a adição extemporânea em nanoemulsões pré-formadas, sendo avaliada a capacidade de incorporação do sistema, as suas características físico-químicas e comportamento de liberação da MQ. Com isso, buscou-se auxiliar na validação de uma prática cada vez mais difundida de um mercado em ampla expansão, que une a nanotecnologia e os fitocompostos na busca de produtos inovadores e de melhor eficiência terapêutica/cosmética.

## MATERIAIS E MÉTODOS

### Materiais

Lecitina de gema de ovo (Lipoid E 80), triglicerídeos de cadeia média (TCM), vitamina E e polissorbato 80, utilizados no preparo das nanoemulsões, foram adquiridos a partir de Lipoid GmbH (Alemanha), Delaware (Brasil), Evonik Degussa (Brasil) e Alpha Química (Brasil), respectivamente. Dióxido de silício coloidal foi fornecido pela Vetec (Brasil) e as inflorescências de *Achyrocline satureioides* utilizada no trabalho foi obtida a partir do CPQBA-UNICAMP (São Paulo, Brasil), sendo uma amostra depositada no herbário do CPQBA-UNICAMP (número 308). Metanol (JT Baker, EUA), acetonitrila (Tedia, Brasil) e ácido fosfórico (Merck) foram utilizados para análises por CLAE.

### Obtenção dos extratos de *Achyrocline satureioides*

O extrato hidroetanólico (HE) de *A. satureioides* foi preparado a partir das inflorescências da planta por meio de maceração em etanol a 80% (v/v) durante oito dias. A proporção planta:solvente utilizada foi de 7,5% (p/v) e o extrato obtido foi filtrado antes da utilização. O extrato seco liofilizado (LIO) foi obtido pela secagem do HE usando liofilizador Edwards Modulyo (EUA). O extrato foi diluído e liofilizado sob condições de temperatura (-60°C) e pressão ( $-10^{-2}$ bar) controlados. Por sua vez, o extrato seco nebulizado (NEB) foi preparado de acordo com a patente de Bassani et. al (2001), através da secagem do HE em Mini-Spray-Dryer Büchi 190 (Alemanha), sob as seguintes condições: alimentação de 160 mL/min, temperatura do ar de entrada, 175 °C, temperatura de saída de ar, 100 °C, e velocidade de rotação do atomizador, 11.000 rpm. Dióxido de silício coloidal e polissorbato 80 foram usados como excipientes em uma proporção de 50% (p/p) do produto final (34% de dióxido de silício coloidal e 16% de polissorbato 80).

### Preparo das nanoemulsões

As nanoemulsões brancas foram obtidas através da técnica de emulsificação espontânea, em que a fase orgânica é vertida sobre a fase aquosa, sob constante agitação magnética e com posterior remoção do solvente orgânico. Neste trabalho, as nanoemulsões foram constituídas de triglicerídeos de cadeia média (7,5%), lecitina de ovo (2%), vitamina E (0,5%), polissorbato 80 (1,0%) e água. A proporção água: solvente (etanol) utilizada foi de 2:1 e a agitação foi mantida por 30 minutos. A remoção do solvente e a concentração da nanoemulsão, por sua vez, foi realizada por evaporação a pressão reduzida, em temperatura de 40°C.

Para a obtenção das nanoemulsões contendo os diferentes extratos, pesou-se determinada quantidade de HE, LIO e NEB, que foi adicionada às nanoemulsões brancas pré-formadas sob constante agitação magnética. A agitação foi mantida por 24 horas. As quantidades de LIO e NEB foram calculadas a partir do resíduo seco de HE, sendo expressas por porcentagem de massa nas nanoemulsões (0,1; 0,25; 0,5; 1,0 e 2,0%). As quantidades em peso (g) de cada componente utilizadas no preparo de 10 mL de formulação encontram-se na Tabela 1.

**Tabela 1:** Quantidade em peso (g) de cada componente necessária para preparo de 10 mL de formulação

Componente	Quantidade (g)		
	HE-NE	LIO-NE	NEB-NE
<b>TCM</b>	0,750	0,750	0,750
<b>Lecitina de ovo</b>	0,2	0,2	0,2
<b>Vitamina E</b>	0,05	0,05	0,05
<b>Polissorbato 80</b>	0,1	0,1	0,1
<b>Extrato HE</b>	0,826; 2,06; 4,13	-	-
<b>Extrato LIO</b>	-	0,012; 0,03; 0,06; 0,12; 0,24	-
<b>Extrato NEB</b>	-	-	0,022; 0,054; 0,108; 0,217; 0,434
<b>Água q.s.p</b>	10	10	10

#### Caracterização físico-química das nanoemulsões

A caracterização físico-química das nanoemulsões foi realizada pela determinação do tamanho médio de gotícula, índice de polidispersão e potencial zeta. O tamanho médio de gotícula e o índice de polidispersão foram obtidos por espectroscopia de correlação de fótons, e o potencial zeta por mobilidade eletroforética. Após a diluição adequada das formulações com NaCl 1mM, as análises foram realizadas em um equipamento Zetasizer Nanoseries ZS 90 (Malvern Instruments). Todos os parâmetros foram avaliados em triplicata em 1 e 180 dias.

#### Determinação do teor dos flavonóides

A determinação do teor dos flavonóides quercetina (QCT), luteolina (LUT) e 3-O-metilquercetina (MQ) nos extratos HE, LIO e NEB, assim como nas nanoemulsões foi realizada por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), utilizando método validado por Bidone et al., (2013). O equipamento de cromatografia utilizado foi um Shimadzu LC-10A, equipado com bomba LC-10 AD, controlador de sistema CBM-10A, injetor automático SIL-10 A e detector UV/vis SPD- 20AV (fixado em 362 nm). A coluna cromatográfica usada foi uma Synergi Polar-RP 150 x 4,6 mm i.d., 4µm (Phenomenex, Torrance, CA), protegida por pré-coluna empacotada com sílica C18 Phenomenex (150 µm , 140 Å). O sistema foi mantido à temperatura de 30 ±

1°C. A fase móvel foi constituída de metanol: ácido fosfórico 1%: acetonitrila (46:44:10 v/v/v), sendo eluída em modo isocrático sob fluxo de 0,8 mL/min. O volume de injeção foi de 20 µL e a diluição final de todas as amostras foi realizada com metanol:ácido fosfórico 0,1% (50:50, v/v).

Os extratos foram diluídos, em um primeiro momento, em etanol 80% e as nanoemulsões em metanol. As diluições finais foram realizadas até que as concentrações de QCT, LUT e MQ fossem cerca de 4,0, 3,0 e 10,0 µg/ml, respectivamente.

#### Estudo de liberação da MQ

O estudo de liberação a partir das formulações contendo o equivalente a 0,25% e 1,0% de extrato de *A. saturoioides* (HE, LIO e NEB) foi realizado com base na técnica das células de difusão tipo Franz, usando membrana sintética de éster de celulose (acetato e nitrato de celulose) com tamanho de poro de 50 nm. Previamente aos experimentos, as membranas foram hidratadas em PBS por 30 minutos, sendo posteriormente dispostas entre os compartimentos doador e receptor das células. O compartimento receptor (10 mL) foi preenchido com PBS:etanol (70:30), sendo mantidas as condições sink. Alíquotas de cada formulação foram colocadas sobre as membranas no compartimento doador. Durante todo o período do ensaio o sistema foi mantido a uma temperatura controlada ( $32 \pm 1$  °C) e sob agitação constante. As coletas do fluido receptor foram realizadas nos tempos 0,5, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 e 8 horas, sendo seguidas de reposição com fluido fresco. A determinação de flavonóides foi realizada por cromatografia líquida como anteriormente descrito. Para avaliação da cinética de liberação da MQ a partir das formulações, os resultados foram ajustados nos modelos matemáticos de Higuchi, ordem-zero e primeira ordem:

$$Q = Q_0 + Kt \rightarrow (\text{cinética de ordem zero})$$

$$\log Q = \log Q_0 - Kt/2.303 \rightarrow (\text{cinética de primeira ordem})$$

$$Q = Kt^{1/2} \rightarrow (\text{Modelo de Higuchi})$$

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

### Teor de flavonóides nos extratos

Os extratos hidroetanólico (HE), liofilizado (LIO) e nebulizado (NEB) de *Achyrocline satureioides* foram preparados conforme descrito em trabalhos prévios de nosso grupo de pesquisa<sup>29,31,32</sup>. Na tabela 2 encontram-se as concentrações dos flavonóides quercetina (QCT), luteolina (LUT) e 3-O-metilquercetina (MQ) nestes extratos, considerando umidade e a presença de 50% de adjuvantes de secagem no extrato NEB. Como pode ser observado, os extratos possuem quantidades de QCT, LUT e MQ de mesma magnitude, podendo ser facilmente comparados. Apresentam cerca de 24-31 µg de QCT, 18-17 µg de LUT e 60-75 µg de MQ por 1 mg de resíduo seco de extrato.

**Tabela 2.** Teor de flavonóides (µg/mg) nos extratos hidroetanólico, liofilizado e nebulizado.

	Teor de flavonóides (µg/mg)*		
	QCT	LUT	MQ
HE	25,80 ± 0,59	18,19 ± 0,10	74,81 ± 0,64
LIO	24,24 ± 0,15	15,87 ± 0,14	61,81 ± 0,26
NEB	31,34 ± 0,18	17,22 ± 0,09	60,64 ± 0,44

\*teor expresso como µg de flavonóide por mg de resíduo seco. Média ± d.p., n=3.

### Obtenção e caracterização das nanoemulsões

#### *Nanoemulsões brancas*

As nanoemulsões foram preparadas pelo método de emulsificação espontânea, amplamente descrito na literatura para a obtenção destes sistemas<sup>4</sup>. O tamanho médio de gotícula, índice de polidispersão e potencial-ζ demonstrados para estas nanoemulsões foi de 187,08 ± 11,13 nm, 0,14 ± 0,07 e -16,73 ± 2,1 mV, respectivamente. De modo geral, nanoemulsões com tamanho médio entre 200-300 nm e índice de polidispersão abaixo de 0,25 são consideradas satisfatórias<sup>10,11,33</sup>. Após a obtenção das nanoemulsões brancas prosseguiu-se a incorporação dos extratos de *A. satureioides* HE, LIO e NEB em concentrações que variaram entre 0,1 e 2%, calculado como resíduo seco de HE, e que representa uma faixa de concentração de flavonóides (QCT, LUT e MQ) entre 90 e 1800 µg/mL de nanoemulsão.

*Nanoemulsões contendo extrato HE*

As nanoemulsões contendo extrato hidroetanólico (80%) de *A. saturoioides* foram obtidas após adição da solução extrativa sobre a nanoemulsão branca pré-formada, em constante agitação. Na tabela 3 podem ser visualizados os resultados obtidos para a caracterização físico-química das nanoemulsões preparadas com o equivalente a 0,1 e 0,25% de resíduo seco de HE. Quantidades equivalentes a 0,5% de resíduo seco conduzem a desestabilização instantânea da formulação, provavelmente devido a elevada proporção de etanol. Em uma formulação contendo solução extrativa equivalente a 0,5% de resíduo seco há mais de 30% de etanol. Embora alguns sistemas nanoestruturados sejam capazes de manter a estabilidade com elevadas proporções de etanol, como os etossomas<sup>34</sup>, as características do sistema empregado neste trabalho possibilitou a manutenção da estabilidade com cerca de 15% de etanol. As formulações contendo 0,1 e 0,25% em resíduo de extrato mostraram-se muito semelhantes entre si com relação a tamanho médio de gotícula, índice de polidispersão e potencial zeta, que foram próximos a 250 nm, 0,1 e -30 mV, respectivamente. A capacidade de incorporação dos flavonóides do extrato HE nas nanoemulsões pré-formadas demonstrou ser bastante elevada, obtendo-se uma recuperação média de QCT acima de 86% e uma recuperação de LUT e MQ acima de 92%.

**Tabela 3:** Resultados de tamanho médio, índice de polidispersão, potencial- $\zeta$  e teor de flavonóides a partir das nanoemulsões contendo extrato HE.

Caracterização Nanoemulsão-HE*						
Resíduo seco (%)	Tamanho médio (nm)	IPD	Potencial- $\zeta$ (mV)	Teor %		
				QCT	LUT	MQ
0,1	247,25 $\pm$ 1,34	0,08 $\pm$ 0,01	-31,05 $\pm$ 5,87	85,66 $\pm$ 2,61	95,04 $\pm$ 2,60	92,74 $\pm$ 2,10
0,25	251,50 $\pm$ 4,38	0,11 $\pm$ 0,01	-32,10 $\pm$ 1,13	97,04 $\pm$ 0,27	99,27 $\pm$ 0,41	97,95 $\pm$ 0,38

\*Média  $\pm$  d.p., n=3.

*Nanoemulsões contendo extrato LIO*

Na tabela 4 encontram-se os valores de tamanho médio de gotícula, índice de polidispersão, potencial- $\zeta$  e teor de flavonóides obtidos após avaliação das nanoemulsões contendo

diferentes concentrações de extrato liofilizado. O extrato foi adicionado às nanoemulsões pré-formadas sem prévia solubilização e uma agitação moderada foi utilizada para sua dispersão na fase aquosa das formulações. A adição de até 0,5% de LIO, calculado como resíduo de HE, acarretou em nanoemulsões com tamanho médio em torno de 230 nm, índice de polidispersão de 0,2 e potencial- $\zeta$  médio de -30 mV. Com quantidades superiores de extrato, equivalente a 1 e 2%, o potencial- $\zeta$  aumenta para -40 mV e, devido a constância dos valores, sugere-se que a interface do sistema torna-se saturada a partir de 1% de LIO. Esta alteração na interface parece interferir também na homogeneidade das formulações, visto que a partir da incorporação de LIO 1% ocorre aumento progressivo do índice de polidispersão, alcançando valor próximo a 0,6 nas formulações contendo LIO 2%, sugerindo formulações polidispersas. Nas nanoemulsões com LIO 2% foi também observada importante queda de teor durante o processo, de 15 a 20%. A dispersão de uma grande quantidade de liofilizado na fase aquosa da nanoemulsão é tecnicamente difícil, o que acarreta em presença de aglomerados de extrato e queda do teor de flavonóides na formulação final.

Pode ser relatado também que os lotes de nanoemulsões obtidos com quantidades de extrato superiores a 0,5% são menos reprodutíveis com relação a tamanho e índice de polidispersão, o que reflete nos elevados desvios-padrão obtidos para estes parâmetros nestas concentrações.

**Tabela 4:** Resultados de tamanho médio, índice de polidispersão, potencial- $\zeta$  e teor de flavonóides a partir das nanoemulsões contendo extrato LIO

Caracterização Nanoemulsão-LIO*						
Resíduo seco (%)	Tamanho médio (nm)	IPD	Potencial- $\zeta$ (mV)	Teor %		
				QCT	LUT	MQ
0,1	231,7 $\pm$ 10,89	0,11 $\pm$ 0,07	-30,15 $\pm$ 1,20	99,32 $\pm$ 4,14	97,42 $\pm$ 3,50	98,35 $\pm$ 4,17
0,25	232,43 $\pm$ 7,19	0,08 $\pm$ 0,05	-32,03 $\pm$ 2,77	92,02 $\pm$ 3,34	94,88 $\pm$ 1,89	98,30 $\pm$ 2,84
0,5	233,27 $\pm$ 77,38	0,20 $\pm$ 0,25	-34,70 $\pm$ 13,1	88,24 $\pm$ 12,88	89,82 $\pm$ 11,92	94,57 $\pm$ 7,39
1,0	224,37 $\pm$ 68,42	0,33 $\pm$ 0,34	-43,40 $\pm$ 12,3	93,00 $\pm$ 8,11	95,67 $\pm$ 6,17	102,33 $\pm$ 6,05
2,0	303,25 $\pm$ 21,85	0,57 $\pm$ 0,02	-47,25 $\pm$ 3,32	77,45 $\pm$ 2,44	75,91 $\pm$ 4,76	81,36 $\pm$ 3,43

\*Média  $\pm$  d.p., n=3.

*Nanoemulsões contendo extrato NEB*

As nanoemulsões contendo extrato nebulizado foram obtidas de modo semelhante às nanoemulsões contendo extrato liofilizado, sendo considerado neste caso a presença dos adjuvantes de secagem. Como pode ser observado na tabela 5, o tamanho médio de gotícula não alterou de forma considerável com a adição de quantidades crescentes de extrato NEB. Comportamento semelhante pôde ser verificado para o índice de polidispersão. Com a adição de NEB 2%, o índice de polidispersão foi bastante superior aos obtidos para demais formulações, no entanto, satisfatório para formulações consideradas monodispersas ( $IPD < 0,25$ ). Considerando os valores de potencial- $\zeta$ , embora uma tendência de aumento possa ser visualizada para as formulações preparadas com 0,25% de NEB, com relação às formulações preparadas com 0,1%, não pode ser afirmado que existe diferença entre as formulações. A determinação do teor de flavonóides, por sua vez, mostrou uma incorporação de 72 a 90% dos flavonóides QCT, LUT e MQ nas nanoemulsões. Com a utilização de 0,5, 1 e 2% de NEB, expresso como resíduo de HE, as taxas de LUT e MQ quantificadas nas nanoemulsões foram superiores às taxas obtidas com 0,1 e 0,25% de NEB. O contato da nanoemulsão branca pré-formada com o extrato, necessário à incorporação dos flavonóides na interface e no núcleo oleoso, provavelmente é dificultado pela presença dos adjuvantes de secagem. Além disso, quando a concentração de extrato adicionada ao sistema é relativamente pequena, a probabilidade de encontro das gotículas oleosas com os complexos extrato-adjuvante de secagem é menor, o que pode também estar auxiliando no menor teor de flavonóides encontrado para as nanoemulsões contendo 0,1 e 0,25% de NEB.

**Tabela 5:** Resultados de tamanho médio, índice de polidispersão, potencial- $\zeta$  e teor de flavonóides a partir das nanoemulsões contendo extrato NEB

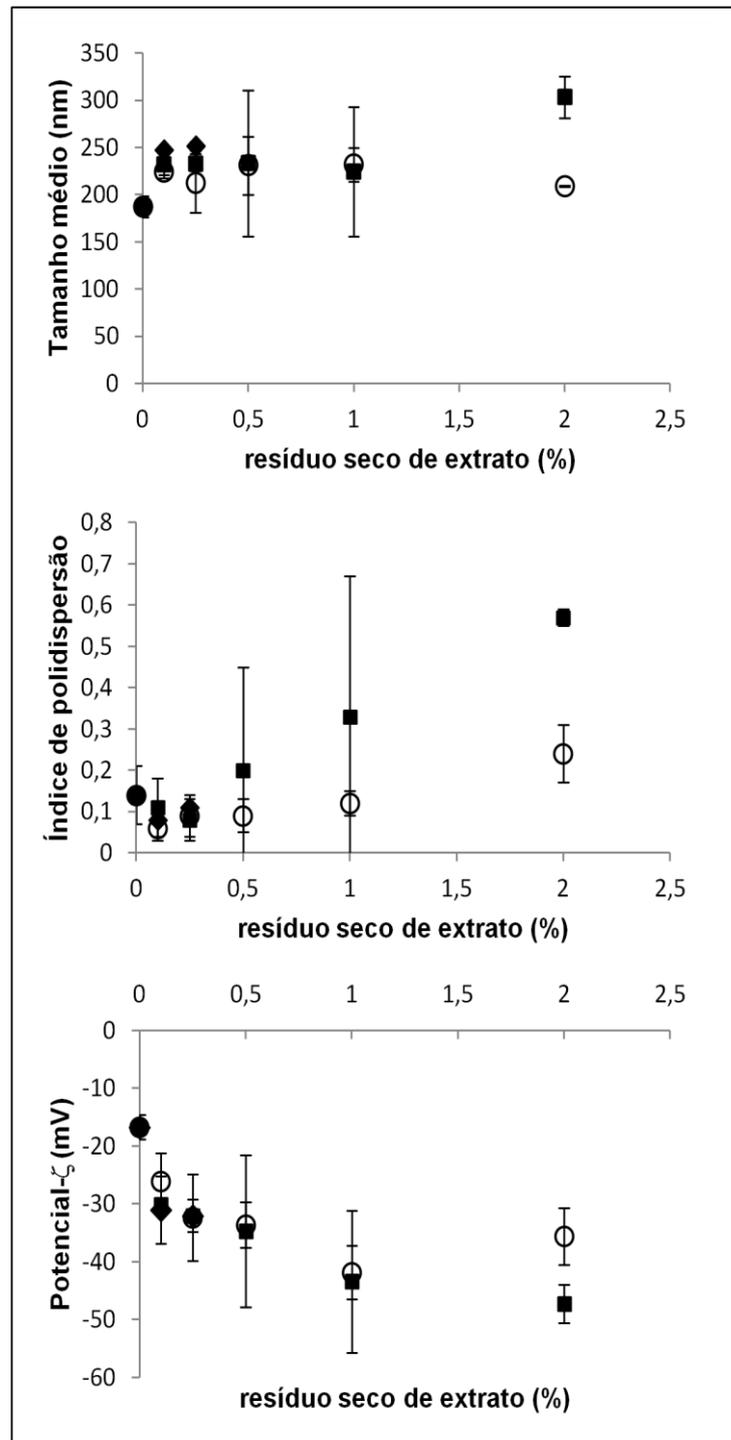
Caracterização Nanoemulsão-NEB*						
Resíduo seco (%)	Tamanho médio (nm)	IPD	Potencial- $\zeta$ (mv)	Teor %		
				QCT	LUT	MQ
0,1	223,95±6,58	0,06±0,03	-26,15±4,88	72,68±0,44	78,70±1,34	73,62±1,41
0,25	212,23±31,37	0,09±0,05	-32,37±7,44	78,63±1,22	78,43±4,35	81,65±1,79
0,5	230,83±30,8	0,09±0,04	-33,63±3,95	79,94±1,50	89,00±1,92	90,67±1,56
1,0	231,83±18,14	0,12±0,03	-41,87±4,65	77,43±3,12	87,95±1,91	89,18±1,54
2,0	209,05±0,49	0,24±0,07	-35,60±4,95	79,31±13,18	86,46±16,63	88,15±13,45

\*Média  $\pm$  d.p., n=3.*Comparação das nanoemulsões com HE, LIO e NEB*

Quando se compara a utilização dos extratos HE, LIO e NEB na obtenção de formulações pela técnica da adição extemporânea de ativos em nanoemulsões pré-formadas, algumas tendências de comportamento podem ser observadas (Figura 1). Com relação à viabilidade de uso, os extratos LIO e NEB mostraram-se mais adequados para o preparo de nanoemulsões com quantidades de extrato superiores a 0,25%. No entanto, estudos futuros devem ser realizadas para avaliar se a presença de 15% de etanol na formulação não a tornaria promissora para administração tópica de fármacos/ativos, mesmo possuindo uma quantidade inferior de extrato quando comparada às outras formulações preparadas neste estudo. Sistemas, como etossomas, que possuem elevada quantidade de solvente na formulação final têm sido considerados para aumentar a penetração cutânea de moléculas através da pele<sup>35</sup>.

Para o parâmetro de tamanho médio de gotícula, observou-se uma tendência de aumento dos valores com a utilização do extrato HE, em todas as concentrações (250 nm), e com o extrato LIO na concentração de 2% (303 nm). A obtenção de nanoemulsões com elevado tamanho de gotícula após incorporação na fase orgânica de quantidades superiores a 1% de resíduo foi relatada em estudo recente<sup>29</sup>. Por outro lado, a utilização do extrato NEB parece conduzir a nanoemulsões com tamanhos de gotículas levemente inferiores. A presença do dióxido de silício coloidal e do polissorbato 80 no sistema, utilizados como adjuvantes de secagem do

extrato NEB, provavelmente auxiliam na estabilização da interface, mantendo as gotículas com um tamanho mais próximo aos obtidos para a formulação branca. Além disso, a presença do dióxido de silício coloidal pode ter elevado a viscosidade do sistema e com isso influenciado no tamanho de gotícula<sup>36</sup>.



**Figura 1:** Comparação de tamanho médio de gotícula, índice de polidispersão e potencial-ζ das nanoemulsões contendo HE (♦), LIO (■) e NEB (○).

A comparação dos resultados obtidos para índice de polidispersão mostra que a utilização de extrato LIO tende à formação de sistemas mais polidispersos. A dispersão do extrato HE na fase aquosa da nanoemulsão é facilitada pela presença do solvente orgânico etanol, bem como os adjuvantes dióxido de silício coloidal e polissorbato 80 devem auxiliar na dispersão do extrato NEB. No entanto, o extrato LIO não dispersa facilmente na fase aquosa durante o processo de incorporação dos flavonóides nas nanoemulsões pré-formadas, o que pode acarretar em uma heterogênea interação do extrato com as gotículas oleosas ou, ainda, na presença de aglomerados de extrato no sistema. Tais fatos contribuiriam para a existência de diferentes populações de gotículas nas formulações finais. Na avaliação do potencial- $\zeta$ , obteve-se que a incorporação dos extratos conduz ao aumento dos valores em módulo, sugerindo que há adsorção de componentes do extrato na interface das nanoemulsões, provavelmente de ácidos fenólicos. Com relação à incorporação de proporções crescentes de extrato, não podem ser visualizadas diferenças com a incorporação de até 0,5% de HE, LIO ou NEB. No entanto, com a adição de 1 ou 2% de LIO há aumento do potencial- $\zeta$ , fato não observado com a adição de 1 ou 2% de NEB. Este comportamento pode estar relacionado com a menor quantidade de componentes do extrato na interface de nanoemulsões contendo NEB. Sugere-se que parte dos flavonóides no extrato NEB permanece adsorvida no dióxido de silício coloidal e não é incorporada na interface. O menor teor de flavonóides encontrado para as formulações contendo NEB em comparação às formulações obtidas com LIO dá suporte a esta observação.

#### Estabilidade preliminar das nanoemulsões

As nanoemulsões preparadas neste estudo foram acondicionadas a 4°C. Após 180 dias de armazenamento, as formulações contendo o equivalente a 0,25 e 1,0% de resíduo de HE foram avaliadas em termos de tamanho médio de gotícula, índice de polidispersão e potencial- $\zeta$ . Na tabela 6 pode ser observado que as nanoemulsões contendo o equivalente a 0,25% de HE, LIO e NEB mantiveram suas características físico-químicas praticamente inalteradas durante os 6 meses de armazenamento, comportamento semelhante demonstrado pela formulação contendo o equivalente a 1% de NEB. Por outro lado, alterações significativas foram observadas para as formulações LIO 1%. A maior parte dos lotes preparados desta

formulação sofreu desestabilização, com separação total de fases após os 180 dias. Os lotes que visualmente se encontravam estáveis demonstraram aumento considerável do tamanho médio de gotícula e do índice de polidispersão, alcançando valores de até 661 nm e 0,83, respectivamente. As formulações LIO 1% foram àquelas que se mostraram mais heterogêneas desde o momento do preparo, como discutido anteriormente.

**Tabela 6:** Caracterização físico-química das formulações contendo 0,25 e 1% de HE, LIO ou NEB após 180 dias de armazenamento a 4°C

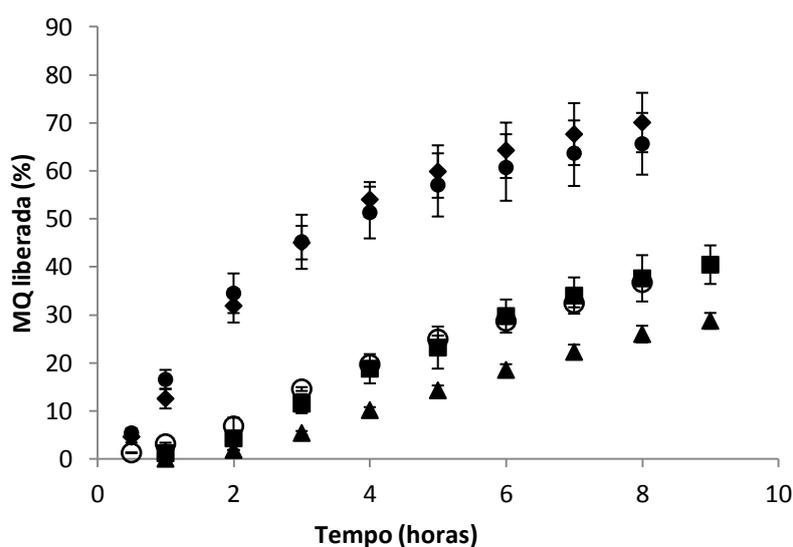
Resíduo seco (%)	Extrato	Tamanho (nm)	IPD	Potencial- $\zeta$ (mV)
<b>0,25</b>	HE	254,60 $\pm$ 3,60	0,11 $\pm$ 0,03	-32,90 $\pm$ 2,00
	LIO	242,45 $\pm$ 12,23	0,09 $\pm$ 0,02	-33,95 $\pm$ 1,77
	NEB	247,15 $\pm$ 8,41	0,06 $\pm$ 0,03	-33,55 $\pm$ 3,46
<b>1,00</b>	LIO	661,17 $\pm$ 78,91	0,83 $\pm$ 0,11	-46,30 $\pm$ 1,27
	NEB	223,50 $\pm$ 13,15	0,17 $\pm$ 0,01	-43,05 $\pm$ 5,87

\*Média  $\pm$  d.p.

#### Estudo de liberação da MQ

No estudo de liberação foi utilizada como marcador a molécula MQ e as formulações avaliadas foram aquelas contendo o equivalente a 0,25 e 1,0% de resíduo de HE, a fim de possibilitar a comparação com nanoemulsões preparadas em estudos anteriores de nosso grupo de pesquisa. Bidone (2013) avaliou a liberação a partir de formulações contendo HE, LIO e NEB preparadas após solubilização dos extratos na fase orgânica das nanoemulsões. Os resultados obtidos para a liberação da MQ a partir das formulações com extratos incorporados em nanoemulsões pré-formadas podem ser visualizados na Figura 2. Como pode ser observado, as nanoemulsões contendo a menor proporção de extrato, 0,25% de resíduo, liberaram a MQ de forma mais lenta que as nanoemulsões contendo o equivalente a 1% de resíduo, independente do tipo de extrato adicionado, HE, LIO e NEB. A liberação a partir das formulações contendo 0,25% de HE ou LIO alcançou valores de até 40%. Por outro lado, a liberação máxima de MQ a partir da formulação contendo 0,25% de NEB foi de 30%, o que pode estar relacionado à presença do dióxido de silício coloidal na fase externa das

nanoemulsões. Para as nanoemulsões contendo o equivalente a 1% de resíduo, a liberação de MQ após 8 horas foi em torno de 70%, tanto com LIO ou NEB. Com a formulação NEB 1% a liberação da MQ foi mais lenta que a partir da formulação LIO 1%, mas com menor influência do dióxido de silício coloidal do que aquela observada com a formulação NEB 0,25%. Estes resultados foram diferentes aos obtidos por Bidone (2013) que visualizou uma liberação significativamente mais lenta a partir da formulação NEB 1%. Estudos mais detalhados são necessários para esclarecer a causa desta diferença de comportamento entre formulações preparadas com diferentes técnicas, mas com a mesma concentração de extrato. Contudo, pode ser sugerido que parte do dióxido de silício coloidal fique no núcleo oleoso da nanoemulsão quando o extrato é incorporado durante a etapa de emulsificação, como foi realizado por Bidone (2013). A presença deste adjuvante na fase interna dificultaria a liberação dos flavonóides a partir da formulação. Com a adição do extrato NEB na nanoemulsão pré-formada, como foi realizado no presente estudo, o dióxido de silício coloidal tende a permanecer na fase aquosa. De um modo geral, nanoemulsões apresentam a liberação do ativo dependente de vários fatores, entre os quais o tamanho das gotículas dispersas, a tensão interfacial entre as fases, o coeficiente de partição do ativo entre as fases e as características reológicas do produto<sup>1</sup>.



**Figura 2:** Perfis de liberação da MQ a partir das nanoemulsões contendo HE (o), LIO (■) ou NEB (▲) a 0,25% ou contendo LIO (◆) ou NEB (●) a 1,0%.

Na tabela 7 encontram-se os valores de coeficiente de determinação ( $r^2$ ) obtidos após ajuste dos perfis de liberação da MQ nos modelos matemáticos de ordem zero, primeira ordem e Higuchi. Todas as formulações, exceto a nanoemulsão com NEB 1%, liberaram a molécula MQ seguindo uma cinética de primeira ordem, em que a taxa liberada é diretamente proporcional à quantidade de fármaco/ativo remanescente no veículo<sup>37</sup>. Este modelo de liberação explica a liberação mais lenta obtida a partir das formulações contendo 0,25% de HE, LIO ou NEB. Por outro lado, a nanoemulsão com NEB 1% liberou a MQ seguindo uma cinética de Higuchi. Neste caso, considera-se que a liberação não é dependente apenas do gradiente de difusão, mas também é influenciada pelo veículo<sup>37</sup>.

**Tabela 7:** Coeficientes de determinação ( $r^2$ ) obtidos após ajuste dos perfis de liberação da MQ nos modelos cinéticos de ordem zero, primeira ordem e Higuchi

Resíduo seco (%)	Extrato	Coeficiente de determinação ( $r^2$ )		
		Ordem-zero	Primeira ordem	Higuchi
0,25	HE	0,992	0,994	0,918
	LIO	0,985	0,995	0,943
	NEB	0,995	0,997	0,905
1,0	LIO	0,917	0,974	0,961
	NEB	0,893	0,957	0,966

## CONCLUSÃO

Neste estudo, a técnica de incorporação de fármacos/ativos em nanoemulsões baseada na adição extemporânea demonstrou ser bastante eficiente na incorporação dos flavonóides quercetina, luteolina e 3-O-metilquercetina a partir de extratos de *Achyrocline satureioides*. As características tecnológicas do extrato influenciaram de forma considerável nos parâmetros de tamanho médio de gotícula, índice de polidispersão e potencial- $\zeta$  das nanoemulsões, sendo este comportamento avaliado pela incorporação de extratos como solução extrativa ou como extratos secos liofilizado e nebulizado. A incorporação dos flavonóides a partir do extrato hidroetanólico foi satisfatória, mas limitada pela concentração de etanol. A utilização do extrato

liofilizado conduziu à obtenção de formulações com populações heterogêneas de gotículas e com menor estabilidade após 180 dias de armazenamento. A adição de extrato nebulizado, por sua vez, levou à formação de nanoemulsões com elevada homogeneidade e estabilidade, no entanto, a presença do dióxido de silício coloidal acarretou em uma liberação mais lenta da 3-O-metilquercetina a partir das formulações. Com isso, conclui-se que a técnica de incorporação em nanoemulsões por adição extemporânea foi satisfatória para moléculas com reduzida hidrossolubilidade. Para uso dos extratos de *A. saturoioides*, a escolha do tipo de extrato e concentração dependerá da aplicação desejada.

## REFERÊNCIAS

1. BRUXEL, F., M. LAUX, L. B. WILD, M. FRAGA, L. S. KOESTER & H. F. TEIXEIRA (2012) *Quím. Nova*. **35**: pp. 1827-40.
2. MA, P. & R. J. MUMPER (2013) *J Nanomed. and Nanotechnol.* **4**: 164. doi: 10.4172/2157-7439.1000164
3. KOURNIATIS, L. R., L. SPINELLI, C. R. E. MANSUR & G. GONZÁLEZ (2010) *Quím. Nova* **33**: pp. 295-300.
4. BOUCHEMAL, K., S. BRIANÇON, E. PERRIER & H. FESSI (2004) *Int J Pharm* **280**: pp. 241-51.
5. MARCATO, P. D. (2009) *Rev. Eletrônica De Farmácia*, **6**: doi:10.5216/ref.v6i2.6545.
6. PEY, C. M., A. MAESTRO, I. SOLÉ, C. GONZÁLES, C. SOLANS & J. M. GUTIÉRREZ (2006) *Colloids Surf., A*. **288**: pp.144-50.
7. BEDIN, A. C. (2011) Nanoemulsões contendo Benzoilmetronidazol: desenvolvimento, caracterização e estudo de liberação in vitro. 110 p. Dissertação (Mestrado em Farmacologia) – Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, Florianópolis.
8. VANDAMME, T. F. & N. ANTON (2010) *Int J Nanomedicine*. **5**: pp.867-73.
9. ANTON, N. & T. F. VANDAMME (2011) *Pharm. Res.* **28**: pp. 978-85.
10. SILA-ON, W., N. VARDHANABHUTI, B. ONGPIPATTANAKUL & P. KULVANICH (2008) *AAPS Pharm. Sci. Tech.* **9**: pp. 684-92.

11. MULLER, R. H., S. SCHMIDT, I. BUTTLE, A. AKKAR, J. SCHMITT & S. BROMER (2004) *Int. J. Pharm.*, **269**: pp. 293-302.
12. AKKAR, A. & R. H. MÜLLER (2003) *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **56**: pp. 29-36.
13. AKKAR, A. & R. H. MULLER (2003) *Eur. J. Pharm. Biopharm* **55 (3)**: pp. 305-12.
14. FRONZA, T., A. CAMPOS & H. TEIXEIRA (2004) *Acta Farm. Bonaerense* **23**: 558-66.
15. TAMILVANAN, S. & S. BENITA (2004) *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **58**: pp. 357-68.
16. POLYDORO, M., K. C. B. SOUZA, M. E. ANDRADES, E. G. DA SILVA, F. BONATTO, J. HEYDRICH, et al. (2004) *Life Sciences* **74**: pp. 2815-26.
17. ARREDONDO, M.F., F. BLASINA, C. ECHEVERRY, A. MORQUIO, M. FERREIRA, J. A. ABIN-CARRIQUIRY, et al. (2004) *J. Ethnopharmacol.* **91**: pp. 13-20.
18. BETTEGA, J. M. R., H. TEIXEIRA, V. L. BASSANI, C. R. M. BARARDI & C. M. O. SIMÕES (2004) *Phytother. Res.* **18**: pp. 819-23.
19. FARAL-TELLO, P.; S. MIRAZO, C. DUTRA, A. PEREZ, L. GEIS-ASTEGGIANTE, S. FRABASILE, et al. (2012) *The Scientific World J.* **2012**: pp. 1-5.
20. MORQUIO, A., F. RIVERA-MEGRET & F. DAJAS (2005) *Phytother. Res.* **19**: pp. 486-90.
21. MARTINS-RAMOS, D., R. L. C. BORTOLUZZI & A. MANTOVANI (2010) *Rev. Bras. Pl. Med., Botucatu.* **12**: pp. 380-97.
22. WOLLENWEBER, E. & V. H. DIETZ (1981) *Phytochemistry* **20**: pp. 869-932.
23. FASOLO, D., V. L. BASSANI & H. F. TEIXEIRA (2009) *Pharmazie* **64**: 726-30.
24. CHIANCONE A. & E. M. LARRECHEA (2012) *Nanotechnol. Law & Business* **9**: pp. 293-308.
25. COULTHURST, S. G. & Jr SEABROOK (2006) Coulthurst, S.G. Seabrook Jr. Liposomes containing phytochemical agents and methods for making and using same (WO200606875A2).
26. CARVALHO E. L. S., G. K. ZORZI, G. L. V. POSER, H. F. TEIXEIRA, J. C. F. MOREIRA & V. L. BASSANI (2008) *Brazil Patent PI0805156-9*.
27. FRÉZARD, F., D. A. SCHETTINI, O. G. F. ROCHA & C. DEMICHELI (2005) *Quim. Nova.* **28**: pp. 511-18.
28. BIDONE, J., G. K. ZORZI, E. L. S. CARVALHO, C. M. O. SIMÕES, L. S. KOESTER, V. L. BASSANI & H. F. TEIXEIRA (2013) Incorporation of *Achyrocline satureioides* (Lam)

- DC flavonoids into topical nanoemulsions obtained by means of spontaneous emulsification procedure. In preparation.
29. BIDONE, J (2013) Nanoemulsões de uso tópico contendo extrato de *Achyrocline satureioides*: estudos de formulação, permeação e atividade anti-herpética. Tese de doutorado - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Farmácia, Programa de pós-graduação em ciências farmacêuticas, Porto Alegre.
  30. BASSANI, V. L., H. F. TEIXEIRA, P. R. PETROVICK, E. M. T. L. SENNA, G. G. ORTEGA, C. M. O. SIMÕES, et al. (2001) *Brazil Patent PI0103468*.
  31. DE SOUZA, K. C. B, V. L. BASSANI & E. E. S. SCHAPOVAL (2007) *Phytomedicine* **14**: pp. 102-08.
  32. PETROVICK, G. F., P. R. PETROVICK & V. L. BASSANI (2010) *Rev. Bras. Farmacognosia* **20**: pp. 803-11.
  33. SILVA, C., E. MARTINI, G. TAVARES, T. SILVEIRA, M. C. de OLIVEIRA & H. F. TEIXEIRA (2006) *Acta Farm. Bonaerense* **25**: pp. 17-21.
  34. TOUITOU, E., N. DAYAN, L. BERGELSON, B. GODIN & M. ELIAZ (2000) *J Control Release*. **65**: PP. 403–18.
  35. UPADHYAY, N., S. MANDAL, L. BHATIA, S. SHAILESH & P. CHAUHAN (2011) *Rec. Res. Sci. Technol.* **3**: pp. 19-24.
  36. LI, Y., J. ZHENG, H. XIAO & D. J. MCCLEMENTS (2012) *Food Hydrocolloids*. **27**: pp. 517-28.
  37. COSTA, P. & J. M. S. LOBO (2001) *Eur. J. Pharm. Sciences*. **13**: pp. 123-33.

## ANEXO

### NORMAS PARA SUBMISSÃO DE TRABALHOS

#### **Manuscript Preparation**

Manuscripts must be neatly typed (size page A4), double-spaced throughout, including figures and tables, with at least 2 cm margins on all sides. The Editor reserves the right to adjust style to certain standards of uniformity. Every page of the manuscript must be numbered at the right top, preceded by the name of the author to whom the correspondence should be sent. The usage of italics should be limited to scientific names of organisms. A cover letter is not required, but if included it should be placed at the beginning of the manuscript.

Manuscripts in general should be organized in the following order:

- *Title*: should be clear, concise, and unambiguously reflect the paper's contents.
- *Name(s) of author(s)*: first name, initial(s) of the middle name(s), and family name of each author. The corresponding author should be identified with an asterisk (\*).
- *Affiliations*: include the name of department (if any), institution, city and state or country where the work was done, indicating which authors are associated with which affiliation.
- *E-mail address of the corresponding author*, as all correspondence, including proofs, should be sent only to him.
- *Summary*: not exceeding 150 words, reporting concisely on the major findings. Many abstracting services use abstracts without modification, so this section should be comprehensible in its own right.
- *Key Words*: at least three and not more than six in alphabetical order will be listed.
- *Introduction*: briefly review important prior publications and state the reasons for the investigation being reported.
- *Materials and methods*: description of methods, equipment and techniques (including statistical treatments used in the research).

- *Results*: efforts should be made to avoid jargon, to spell out all non-standard abbreviations the first time they are mentioned and to present the contents of the study as clearly and concisely as possible.
- *Discussion* (may be combined with the Results section).
- *Conclusions (at the author's discretion)*: must not reiterate any discussion or introductory comments, they must be genuine conclusions drawn from the results of the study.
- *Acknowledgements* and any additional information concerning research grants, etc.
- *References*: will be numerated correlatively as they are cited in the text and listed separately under the title "References" (please use a hanging indent: second and subsequent lines indented). The style used for citation of articles in journals (1), monographs (2), chapters in books (3), and internet references (4) which must be strictly observed, is given in the following examples:

- (1) Medeiros R., G.F. Passos, C.E. Vitor J. Koepp, T.L. Mazzuco, L.F. Pianowski, M.M. Campos & J.B. Calixto (2007) *Brit. J. Pharmacol.* **151**: 618-27.

*Journal names should be abbreviated according to ISI style (you are invited to consult the sites [http://www.efm.leeds.ac.uk/~mark/ISlabbr/A\\_abrvjt.html](http://www.efm.leeds.ac.uk/~mark/ISlabbr/A_abrvjt.html) or [http://images.isiknowledge.com/WOK46/help/WOS/L\\_abrvjt.html](http://images.isiknowledge.com/WOK46/help/WOS/L_abrvjt.html))*

- (2) Vogel, W.H., B.A. Scholkens, J. Sandow & G. Muller (2002). *"Drug discovery and evaluation, Pharmacological assay"*, Second Edition, Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, New York, pp. 906-44.
- (3) Aristide, V. & J.W. Martin (2005) *"Doxorubicin"*, in "Analytical profiles of drug substances" (F. Klaus, ed.), Academic Press, New York, pp. 245-74.
- (4) Duke, J.A. *"Medical Botany. Module 8: Amazonian (Iberoamerican)"*. Available at (<http://www.ars-grin.gov/duke/syllabus/module8.htm>).

For 2-6 authors all authors are to be listed, with "&" separating the last two authors; for more than six authors, use the first six authors followed by *et al.* For three or more authors use *et al.* in the text.

- *Tables and Figures:* will be numbered using Arabic numerals in the order they appear in the text. *Letters and symbols included into the figures should be made in a suitable size, since figures are usually reduced to half a column wide size (7.5 cm).* Photographs, charts and diagrams are all to be referred to as "Figures". They should accompany the manuscript. All illustrations should be clearly marked with the figure number. All figures are to have a self-explanatory caption. Captions of Tables and Figures should be supplied on a separate sheet.