

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

Faculdade de Farmácia

Trabalho de Conclusão de Curso de Farmácia

**Desenvolvimento e caracterização de anfissoma com derivado de cloroacetamida
para tratamento antifúngico**

Luiz Augusto Maschmann Inácio

Porto Alegre, dezembro de 2018

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

Faculdade de Farmácia

Trabalho de Conclusão de Curso de Farmácia

**Desenvolvimento e caracterização de anfissoma com derivado de cloroacetamida
para tratamento antifúngico**

Luiz Augusto Maschmann Inácio

Orientadora: Prof. Dra. Irene Clemes Külkamp Guerreiro

Coorientadora: MsC. Simone Jacobus Berlitz

Porto Alegre, dezembro de 2018

O presente trabalho foi desenvolvido no Laboratório 307 vinculado ao grupo de pesquisa orientado pela Profa. Dra. Irene C. Kulkamp Guerreiro, na Faculdade de Farmácia, unidade acadêmica da Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

“Talvez não tenha conseguido fazer o melhor, mas lutei para que o melhor fosse feito. Não sou o que deveria ser, mas Graças a Deus, não sou o que era antes”.

Marthin Luther King

Agradecimentos

Primeiramente, agradeço a Deus pela luz e força concebida diariamente, mas principalmente nessa jornada acadêmica, para alcançar a conquista nesse objetivo.

Aos meus pais, Adalberto e Eloci, muito obrigado. Agradeço por terem me ensinado a lutar pelos objetivos, incentivando e possibilitando a realização dos estudos. Essa conquista só foi alcançada graças ao apoio de vocês.

Agradeço também a Letícia, minha namorada e companheira, que esteve comigo desde o início até o fim da faculdade, apoiando, estudando junto, ouvindo minhas reclamações, comemorando minhas conquistas e compreendendo a ausência muitas vezes. E também sou muito grato a Antônia, por me mostrar um novo sentido de viver, trazendo alegria e força para seguir em busca dessa conquista e de tantas outras que virão. Muito obrigado a vocês duas.

As minhas irmãs, cunhados e sobrinhos, muito obrigado. Por terem me incentivado e apoiado nessa caminhada, trazendo alegria e parceria em momentos difíceis, fazendo sentido à palavra família.

Aos amigos e colegas da faculdade que estão comigo do início ao fim, Antônio, Bárbara, Germano e Júlia, muito obrigado. E também aqueles que nos aproximamos com o tempo, Bruna, Giuliano, Marianne e tantos outros colegas que estiverem presentes e ficarão guardados na memória. Também sou grato aos meus amigos de infância, da escola e do dia-a-dia por torcerem e estarem comigo. A todos vocês, agradeço por compartilhar tanto momentos bons, quanto momentos difíceis e de estresse, que foram amenizados por ser dividido com vocês.

Agradeço a minha orientadora profa. Irene, tanto na monitoria até o trabalho final, e coorientadora Simone, pela orientação, incentivo, palavras de apoio, dicas e ensinamentos, muito obrigado. Também agradeço a Gabriella, não somente pelos ensaios, mas também pelas orientações e aprendizado.

E por fim, agradeço a profa. Silvia Guterres e prof. Alexandre Fuentefria pela disponibilidade dos laboratórios para realização de parte deste trabalho, bem como a profa. Renata Contri pelas análises importantes.

Este artigo foi elaborado segundo as normas da Revista Brasileira de Farmácia apresentadas em anexo (ANEXO A).

1 **Desenvolvimento e caracterização de anfissoma com derivado de cloroacetamida**
2 **para tratamento antifúngico**

3

4 Luiz Augusto Maschmann Inácio¹, Simone Jacobus Berlitz², Gabriella da Rosa Monte Machado³,
5 Stefânia Neiva Lavorato⁴, Ricardo José Alves⁴, Saulo Fernandes de Andrade^{1,3,5}, Alexandre
6 Meneghello Fuentefria^{1,3,5} & Irene Cledes Kulkamp Guerreiro^{1,2,5} *.

7

8 ¹Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Av Ipiranga, 2752, Santana,
9 Porto Alegre, RS, 90610-000, Brasil.

10 ²Programa de Pós-Graduação em Nanotecnologia Farmacêutica, Universidade Federal do Rio
11 Grande do Sul, Av. Ipiranga, 2752, Santana, Porto Alegre, RS, 90610-000, Brasil.

12 ³Programa de Pós Graduação em Microbiologia Agrícola e do Ambiente, Universidade Federal do
13 Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brasil.

14 ⁴Departamento de Produtos Farmacêuticos, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Minas
15 Gerais, Belo Horizonte, Brasil.

16 ⁵Programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Rio Grande do
17 Sul, Porto Alegre, Brazil.

18

19 ***Autor correspondente:**

20 Irene Cledes Kulkamp Guerreiro

21 Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul,

22 Av. Ipiranga, 2752, Santana, Porto Alegre, RS, 90610-000, Brasil.

23 Telefone (+55) 51 33085416

24 irene@ufrgs.br

25 RESUMO

26 As infecções fúngicas são um problema crescente para a saúde pública, pois estão relacionadas
27 diretamente com aumento da incidência das taxas de morbidade e mortalidade. O diagnóstico para
28 essas infecções nem sempre se apresenta de forma confiável e adequada, necessitando de tratamento
29 antifúngico que, gradativamente, demonstra-se ineficiente. Os antifúngicos disponíveis possuem
30 diversos relatos de toxicidade ao paciente, além disso, a seleção de isolados fúngicos resistentes
31 vem aumentando consideravelmente. Sendo assim, é necessária a ampliação de opções terapêuticas
32 para tratamento antifúngico adequado e mais eficaz. Os derivados de cloroacetamidas juntamente
33 com a nanotecnologia demonstram ser uma alternativa promissora. Por essa razão, o objetivo deste
34 trabalho foi desenvolver uma formulação nanotecnológica, denominado anfissomas, contendo um
35 derivado de cloroacetamida (CBr), com intuito de avaliar o perfil antifúngico deste sistema e propor
36 uma alternativa de tratamento contra candidíases e dermatofitoses. Os anfissomas desenvolvidos
37 apresentaram tamanho e distribuição, pH, teor e taxa de incorporação adequados. Os valores das
38 concentrações inibitórias mínimas (CIM's) apresentam-se na faixa de 6,25 a 25,00 µg/mL para os
39 anfissomas, contendo CBr, frente às cepas dermatofíticas. Observou-se prevalente diminuição da
40 CIM quando o composto foi incorporado à nanoformulação, indicando que a nanotecnologia pode
41 ser uma alternativa promissora para tratamento de infecções fúngicas.

42 **Palavras-chave:** Nanotecnologia, Anfissomas, Tratamento antifúngico, Derivados de
43 cloroacetamidas.

44

45

46

47

48

49 **ABSTRACT**

50 Fungal infections are a growing problem for public health because they are related to the increase of
51 morbidity and mortality. The diagnosis of these infections is not always trustworthy and accurate
52 and its antifungal treatment gradually shows to be inefficient. Several toxicity cases have been
53 associated with antifungal treatment and antifungal drug resistance have been increasing over the
54 years. Therefore, it is necessary to broaden the therapeutic options aiming at an adequate and
55 efficient antifungal treatment. Chloroacetamide derivatives along with nanotechnology seems to be
56 a promising option. Thus, the aim of this study was to develop nanotechnology formulation, entitled
57 anfisomes, loaded with a chloroacetamide derivative (CBr) and to evaluate the antifungal profile of
58 this nanosystem and offer a new option for the treatment of candidiasis and dermatophytosis. The
59 developed amphisome presented particle size and size distribution within the nanoscale, pH suitable
60 for skin application and high drug content and incorporation rate. The minimum inhibitory
61 concentrations (MICs) showed ranged of 6,25 to 25,00 µg/mL for the drug-loaded anfisomes, for
62 the dermatophytic strains there was a decrease of the MICs when the drug was loaded into the
63 nanosystem. It was observed the prevalence of MIC reduction when the CBr compound was
64 incorporated into the nanoformulation, indicating that nanotechnology could be a promising option
65 for antifungal treatment.

66 **Keywords:** Nanotechnology, Anfisomes, Antifungal treatment, Chloroacetamide derivatives.

67

68

69

70

71

72 INTRODUÇÃO

73 As infecções fúngicas são um crescente problema para a saúde pública, visto que tem
74 apresentado aumento em sua incidência nos últimos anos (Bongomin *et al.*, 2017). Leveduras do
75 gênero *Candida* podem causar desde manifestações simples até infecções disseminadas e graves
76 (Whaley *et al.*, 2017; Jabra-Rizk *et al.*, 2016). Essas infecções são classificadas de acordo com o
77 tecido infectado, podendo ser: superficiais, cutâneas, mucosas (como as candidíases) e sistêmicas
78 (como as candidemias) (Pippi *et al.*, 2017). A incidência aumenta consideravelmente em indivíduos
79 imunocomprometidos, como, por exemplo, HIV-positivos, pacientes submetidos à transplante de
80 órgãos e uso de terapias com corticosteroides (Moazeni, Asgari & Nabili, 2018; Bongomin *et al.*,
81 2017).

82 As dermatofitoses, por sua vez, são infecções fúngicas cosmopolitas, com crescente
83 incidência; apresentando-se especialmente nos países em desenvolvimento (Lana *et al.*, 2016;
84 Coulibaly *et al.*, 2016). Paralelamente às candidíases, as dermatofitoses são altamente prevalentes e
85 atingem tanto indivíduos imunocomprometidos, quanto imunocompetentes (Davidson, Netea &
86 Kullberg, 2018). O impacto que esse tipo de doença causa na população também está atribuído à
87 dificuldade de se obter diagnóstico confiável e tratamento disponível e adequado (Bongomin *et al.*,
88 2017). Por conseguinte, é importante e necessário que novas alternativas terapêuticas sejam
89 investigadas, justamente para ampliar as opções de tratamento, assim como aumentar a eficácia dos
90 fármacos, combater a resistência fúngica, diminuir os efeitos adversos e toxicidade e ampliar o
91 espectro de atividade frente aos organismos fúngicos (Chang *et al.*, 2017; Pippi *et al.*, 2017).

92 Dentre as possíveis opções terapêuticas atuais, podem-se citar os derivados de
93 cloroacetamidas que apresentam atividade antifúngica (Katke *et al.*, 2011; Aschale, 2013), além de
94 antiviral, anti-helmíntica e anti-inflamatória (Aschale, 2013). A atividade biológica destes derivados
95 está relacionada com a alquilação dos nucleófilos, principalmente, com aqueles que apresentam
96 “tioI” em sua estrutura (Aschale, 2013). No presente trabalho, utilizou-se um dos derivados de
97 cloroacetamidas, denominado 2-cloro-N-(4-bromofenil) acetamida (CBr). Desta forma, avaliando a

98 promissora relevância apresentada pelos derivados de cloroacetamidas no âmbito farmacológico,
99 aliada à crescente multirresistência fúngica aos fármacos disponíveis no mercado, justifica-se o
100 estudo com esta classe de compostos (Lavorato *et al.*, 2017).

101 Considerando a necessidade de novas alternativas para o tratamento antifúngico, em
102 combinação com a possibilidade de utilização dos derivados de cloroacetamidas, pode-se citar o uso
103 da nanotecnologia. Esse modelo de tecnologia facilita e melhora a penetração dos fármacos
104 antifúngicos no local de ação, auxilia na eliminação dos micro-organismos mais eficientemente,
105 diminui a toxicidade e efeitos adversos, e também contribui para a redução da resistência aos
106 tratamentos (Voltan *et al.*, 2016; Gaba *et al.*, 2015; Hernandez-Delgadillo *et al.*, 2013). Por essas
107 razões, o presente trabalho conta com um sistema nanotecnológico de liberação de fármaco. Esse
108 sistema, denominado anfissomas, sem precedentes na literatura, encontra-se com patente depositada
109 no Brasil em 2018 (BR 10 2018 067690 3). Os anfissomas apresentam-se com uma estrutura
110 supramolecular composta por núcleo polimérico catiônico envolto de um invólucro lipídico
111 anfifílico, que possibilita tanto a incorporação de compostos ativos hidrofílicos, quanto lipofílicos,
112 em altas taxas, mantendo-se uma estrutura biocompatível e estável frente a diferentes valores de pH,
113 além de garantir a liberação controlada de ativos. É interessante acrescentar também que sistemas
114 nanoestruturados garantem um maior contato com a superfície cutânea, devido à sua elevada área
115 superficial e baixo tamanho de partícula sendo, desta forma, interessantes para incorporação de
116 ativos com aplicação tópica. Outra vantagem é diminuir a necessidade de administrar fármacos de
117 forma sistêmica, reduzindo a dose necessária para atingir o local de ação e também os efeitos
118 adversos (Goyal *et al.*, 2016; Gaba *et al.*, 2015; Antonio *et al.*, 2014).

119 O desenvolvimento de formulações com novos agentes antifúngicos é uma alternativa para o
120 tratamento de dermatofitoses e candidíases. Sendo assim, o objetivo deste estudo foi desenvolver e
121 caracterizar uma formulação nanotecnológica, denominado anfissoma, para veiculação do composto
122 CBr e posterior avaliação de seu perfil antifúngico, assim como propor uma nova alternativa de

123 tratamento que diminua os riscos de toxicidade, efeitos adversos e resistência, propiciando
124 adequado tratamento antifúngico.

125

126 **MATERIAIS E MÉTODOS**

127 **Materiais**

128 O composto 2-cloro-N-(4-bromofenil) acetamida (CBr) foi sintetizado por Lavorato *et al.*,
129 2017 e cedido por Ricardo José Alves (Universidade Federal de Minas Gerais - UFMG). O
130 Eudragit® RS 100 (EUD RS 100) foi cedido por Evonik® (Alemanha). O componente monooleína
131 foi adquirido de Sigma-Aldrich® (Estados Unidos), acetona da Êxodo Científica® (Brasil),
132 polissorbato 80 da Alpha Química (Brasil) e metanol da Synth® (Brasil).

133

134 **Desenvolvimento das partículas anfissomas**

135 O anfissoma foi preparado conforme descrito por Guerreiro *et al.*, 2018 (BR 10 2018
136 067690 3). A fase orgânica (FO) consiste em Eudragit RS 100 (100 mg), monooleína (250 mg) e
137 acetona (27 mL), enquanto que a fase aquosa (FA) é composta por polissorbato 80 (77 mg) e água
138 ultra purificada (53 mL). Os componentes da FO foram dissolvidos, sob agitação mecânica, em
139 banho de água à temperatura de 40 °C. Após solubilização, o CBr (10 mg) foi adicionado e mantido
140 nas mesmas condições até completa solubilização. Em seguida, a FO foi vertida para a FA,
141 previamente preparada nas mesmas condições de temperatura e agitação. Após 10 minutos, a
142 suspensão foi evaporada sob pressão reduzida no evaporador rotativo Büchi R-100 (Suíça) para a
143 remoção do solvente e obtenção do volume de 10 mL. Quando necessário, o volume final foi
144 ajustado para 10 mL com água ultra purificada em balão volumétrico.

145

146 **Caracterização Físico-Química**

147 *Análise macroscópica*

148 Todas as amostras, após seu preparo, foram avaliadas macroscopicamente quanto a sua
149 coloração, homogeneidade e ausência de materiais particulados.

150 *Determinação do pH*

151 O pH das formulações foi determinado, sem diluição, pelo medidor de pH Digimed DM-22,
152 através da técnica de potenciometria. Calibrou-se o medidor com duas soluções padrão, uma de pH
153 4,0 e outra de pH 7,0, sob temperatura de 25 °C.

154 *Distribuição de tamanho e tamanho da partícula*

155 O tamanho e distribuição das partículas foram determinados pela técnica de Difração de
156 Laser (Malvern® 2000 Mastersizer, Malvern Instruments, Reino Unido). As formulações foram
157 adicionadas diretamente no equipamento, contendo água destilada, para análise.

158 Os resultados de tamanho foram exibidos pelo valor D[4,3], considerando-se o volume das
159 partículas e representando o diâmetro médio expresso pelo volume da esfera correspondente
160 (Equação 1). A distribuição de tamanho é expressa pelo valor de Span (Equação 2), considerando
161 $D_{0,1}$, $D_{0,5}$ e $D_{0,9}$ como os diâmetros de 10, 50 e 90 % da curva de distribuição. Ambos foram
162 calculados por número (n) e volume (v) de partículas.

$$163 \quad D[4,3] = \frac{\sum d^4}{\sum d^3} \quad (1)$$

$$164 \quad Span = \frac{D_{0,9} - D_{0,1}}{D_{0,5}} \quad (2)$$

165 Outra técnica utilizada para avaliação do tamanho das partículas foi a de Espalhamento de
166 Luz Dinâmica (Zetasizer Nano ZS®, Malvern Instruments, Reino Unido), a 25°, num ângulo de

167 173°. As amostras foram diluídas (1:500 v/v) em água ultra purificada. Os resultados obtidos foram
168 apresentados por diâmetro médio (Z-average) e pelo índice de polidispersão (PDI) (Equação 3).

169
$$PDI = \sigma^2 / Z_D^2 \quad (3)$$

170 **Potencial Zeta**

171 O potencial zeta das partículas foi determinado pela mobilidade eletroforética em
172 equipamento Zetasizer® (Malvern Instruments, Reino Unido). As formulações foram diluídas 500
173 vezes (v/v) em solução de NaCl 10 mM, previamente filtrada em membrana 0,45 µm (Filtrilo®,
174 Brasil), sob temperatura de 25 °C.

175 **Ensaio de teor e taxa de incorporação**

176 A quantificação do CBr foi realizada empregando-se Espectrofotômetro UV/Vis UV-1800
177 (Shimadzu®, Japão) no comprimento de onda de 250 nm. Foram avaliadas a linearidade,
178 especificidade e precisão do método, na faixa de concentração de 6 a 18 µg/mL, com média de
179 coeficiente de correlação (r^2) referente às três curvas-padrão de 0,9994, coeficiente angular de
180 0,0764 e coeficiente linear igual a - 0,0862.

181 Para determinar a taxa de incorporação, o CBr foi avaliado no ultrafiltrado, obtido pela
182 técnica de ultrafiltração-centrifugação (Amicon® 10.000 MW, Millipore) em centrifuga, a 4500
183 rpm, por 10 minutos. O ultrafiltrado foi quantificado por Espectrofotômetro UV/Vis e a taxa de
184 incorporação (Equação 4) foi calculada pela diferença entre a concentração total do fármaco e a
185 concentração livre (no ultrafiltrado).

186
$$\text{Taxa de Incorporação (\%)}: \frac{C_{Total} - C_{Ultrafiltrado}}{C_{Total}} \times 100 \quad (4)$$

187

188

189 ***Estudos de estabilidade***

190 A estabilidade das formulações foi monitorada através dos parâmetros: aspecto, pH, teor,
191 tamanho e distribuição de tamanho da partícula, mantidas sob temperatura de 4 °C, em geladeira,
192 sendo avaliada em 7, 15 e 30 dias.

193

194 **Teste de suscetibilidade antifúngica**

195 ***Isolados clínicos selecionados***

196 Neste estudo, um total de 11 isolados clínicos foram testados. Das quais, quatro isolados de
197 *Candida* spp.: *C. albicans* (ATCC 18804), *C. krusei* (RL 52), *C. parapsilosis* (RL 38) e *C.*
198 *tropicalis* (CT 94 P), juntamente com sete isolados dermatofíticos: *Microsporum canis* (MCA 01 e
199 MCA 29), *M. gypseum* (MGY 58 e MGY 50), *Trichophyton mentagrophytes* (TME 60) e *T. rubrum*
200 (TRU 45 e TRU 51). Os isolados de *Candida* foram analisados fenotipicamente em Vitek® *Yeast*
201 *Biochemical Card*. Todos os isolados clínicos são provenientes da micoteca do Grupo de Pesquisa
202 em Micologia Aplicada da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (Porto Alegre, Brasil) e
203 originadas do Programa Nacional de Controle de Qualidade (PNCQ). A cepa padrão ATCC 18804
204 foi obtida da ATCC (*American Type Culture Collection, Manassas, VA, EUA*) e utilizada como
205 controle.

206 ***Teste de suscetibilidade antifúngica***

207 A avaliação da atividade antifúngica dos anfissomas, contendo o composto CBr, foi
208 realizada através da técnica de microdiluição em caldo, seguindo, conforme preconizado, os
209 documentos M27-A3 e M38-A2 (CLSI, 2008). Em paralelo, uma solução contendo o composto
210 livre foi preparada em 2 % de DMSO (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) e o restante do volume
211 completado com meio RPMI 1640 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) obtendo-se uma
212 concentração final de 400 µg/mL. Para as leveduras, as suspensões fúngicas foram diluídas em uma

213 solução de NaCl 0,85 % e foram lidas em espectrofotômetro (GT7220, Global Trade Technology)
214 em comprimento de onda de 530 nm, obtendo-se uma turbidez equivalente a 0,5 da escala
215 Mcfarland (90 % de transmitância), com aproximadamente $1 \text{ a } 5 \times 10^6$ UFC/mL. Após a leitura, as
216 suspensões fúngicas foram diluídas 1:50 (NaCl 0,85 %) e, a partir desta, uma diluição 1:20 em
217 meio RPMI 1640 foi preparada, obtendo-se um inóculo final com $1 \text{ a } 5 \times 10^3$ UFC/mL para cada
218 cepa. Para as cepas dermatofíticas, as suspensões fúngicas obtiveram transmitância de 80-82% em
219 comprimento de onda de 530 nm. Por fim, uma diluição final 1:50 contendo $2 \text{ a } 6 \times 10^3$ UFC/mL
220 para cada cepa foi preparada em meio RPMI 1640 e utilizada no experimento. As microplacas
221 contendo a microdiluição em caldo foram incubadas a 35 °C por 48 h e a 32 °C por 96 h para as
222 cepas de *Candida* spp. e para as cepas dermatofíticas, respectivamente. A concentração inibitória
223 mínima (CIM) foi definida como a menor concentração na qual o anfissoma foi capaz de inibir 100
224 % de crescimento fúngico, quando comparado ao controle positivo e através de leitura visual.

225 **Análise estatística**

226 A análise estatística foi realizada utilizando o software GraphPad Prism 7.02, através dos
227 testes de variância univariada (ANOVA) e seguida do teste Tukey de comparações múltiplas, com
228 nível de significância de 0,05.

229

230 **RESULTADOS E DISCUSSÃO**

231 **Caracterização e estabilidade dos anfissomas**

232 Os anfissomas desenvolvidos apresentaram aspecto homogêneo e leitoso, coloração
233 esbranquiçada e ausência de precipitação. Todas as formulações apresentaram tamanho
234 nanométrico, com distribuição monomodal (Figura 1a e b), potencial zeta positivo, pH levemente
235 ácido. O teor total foi de $101,31 \pm 0,81$ %, com uma eficiência de encapsulação de 93,59 %. Os

236 resultados obtidos na caracterização, referentes ao pH, teor, distribuição de tamanho e tamanho
237 estão na Tabela 1.

238 Para sistemas nanocarreadores, o tamanho da partícula implica diretamente na absorção dos
239 fármacos, desta forma, de acordo com os resultados apresentados, os anfissomas demonstraram
240 tamanhos de partículas adequados para garantir adesão e interação com as células biológicas,
241 promovendo eficiência na atividade antifúngica (Tian *et al.*, 2017). O valor de pH obtido está dentro
242 da faixa permitida para uso tópico que é entre 4,5 a 7,5 (Daut *et al.*, 2015). Avaliando o teor do
243 composto na formulação, é possível inferir que não houve perda no processo de produção. A
244 eficiência de incorporação é considerada satisfatória, com valor próximo ao encontrado
245 anteriormente (BR 10 2018 067690 3), que foi de 98 % quando se utilizou fármaco hidrofóbico na
246 mesma partícula. O presente trabalho conta com um sistema de liberação de fármacos sem
247 precedentes na literatura e com composto não testado anteriormente em formulações
248 nanotecnológicas e para uso tópico. Os benefícios das partículas carregadas positivamente são
249 relatados na literatura para o tratamento tópico, pois as mesmas apresentam maior grau de ligação
250 na pele, já que esse tecido é carregado negativamente, sendo assim, aumentando a penetração dos
251 fármacos por essa via de administração mais eficientemente (Davidson, Netea & Kullberg, 2018).

252 A formulação, sob armazenamento a 4 °C, não demonstrou alteração nos valores dos
253 parâmetros avaliados (Tabela 2). Exceto, o parâmetro teor que apresentou decréscimo no tempo 7
254 quando comparado com o tempo 0, mantendo-se estável no tempo 7, 15 e 30 dias. Esse resultado
255 pode estar relacionado com uma reação química entre o polímero do anfissoma e o composto, ao
256 qual o CBr pode ser adsorvido na superfície da estrutura ou até mesmo ocorrer desestabilização. Já
257 é previsto e relatado na literatura que a estabilidade de nanopartículas pode apresentar algumas
258 limitações, tais como, agregação, estabilidade do polímero e do fármaco, e também liberação
259 antecipada da substância ativa (Ghasemiyeh & Mohammadi-Samani, 2018; Voltan *et al.*, 2016).

260

261

262 **Teste de susceptibilidade antifúngica**

263 O perfil de susceptibilidade dos anfissomas contendo o composto CBr e do composto livre
264 foi testado frente a diferentes espécies de fungos leveduriformes e filamentosos. Estes resultados
265 estão expressos na Tabela 3.

266 Neste estudo, o anfissoma, contendo CBr, demonstrou maior eficácia contra à maioria dos
267 isolados clínicos dermatofíticos, em comparação com o fármaco livre, indicando considerável
268 atividade da formulação contra as espécies testadas. A formulação frente às espécies *Microsporum*
269 *gypseum* (MGY 58) e *Microsporum canis* (MCA 29), apresentou as menores CIMs. Por outro lado,
270 a ação do anfissoma, com o composto, sobre os isolados leveduriformes, manteve-se igual ao
271 composto livre, indicando que a incorporação do CBr na formulação não reduziu a atividade
272 antifúngica do mesmo. O anfissoma sem a presença do fármaco (nanoestrutura “branca”) não foi
273 capaz de inibir o crescimento fúngico, comprovando que a ação antifúngica é exclusiva do
274 composto CBr. As diferenças no perfil de suscetibilidade de leveduras e fungos filamentosos ao
275 composto avaliado podem estar relacionadas às características morfológicas de cada gênero,
276 afetando a permeação da substância ativa nas células fúngicas (Fukuda *et al.*, 2009).

277 A atividade antifúngica dos derivados de cloroacetamidas foi avaliada anteriormente contra
278 *Candida* spp. (Katke *et al.*, 2011). No entanto, não é possível realizar uma comparação, pois não
279 está determinada a espécie de *Candida* testada e a metodologia utilizada para determinar os valores
280 de CIM foi o de difusão em ágar. Para os fungos dermatofitos, não há estudos na literatura que
281 avaliem a ação desses compostos.

282 Desta forma, avaliando os resultados obtidos pelo teste de susceptibilidade, pode-se inferir
283 que os anfissomas apresentam-se como uma nova alternativa para veiculação do composto CBr e
284 também como tratamento antifúngico tópico, principalmente frente às espécies dermatofíticas.

285

286

287

288 **CONCLUSÃO**

289 Os anfissomas, contendo o composto CBr, apresentaram tamanho nanométrico com baixa
290 distribuição de tamanho, taxa de incorporação e pH adequados para uso tópico. O teste de
291 susceptibilidade indica que a nanoformulação é uma alternativa promissora e interessante para
292 tratamento antifúngico tópico, principalmente para dermatofitoses.

294 **REFERÊNCIAS**

295 Aschale M. Synthesis and Antimicrobial Evaluation of Some Novel Substituted 2-
296 chloroacetalides. *International Journal of ChemTech Research*, 4 (4): 1437-1441, 2013.

297 Antonio JR, Antônio CR, Cardeal ILS, Ballavenuto JMA, Oliveira JR. Nanotechnology in
298 dermatology. *Anais Brasileiros de Dermatologia*, 89(1): 126 – 136, 2014.

299 Bongomin F, Gago S, Oladele RO, Denning DW. Global and Multi-National Prevalence of Fungal
300 Diseases—Estimate Precision. *Journal of Fungi*, 3(4): 57, 2017.

301 Chang YL, Yu SJ, Heitman J, Wellington M, Chen YL. New facets of antifungal therapy.
302 *Virulence*, 8(2): 222–236, 2017.

303 Coulibaly O, Kone AK, Niaré-Doumbo S, Goita S, Gaudart J, Djimdé AA, Piarroux R, Doumbo
304 OK, Thera MA, Ranquel S. Dermatophytosis among Schoolchildren in Three Eco-climatic Zones of
305 Mali. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 10(4): 1–13, 2016.

306 Daudt RM, Back PI, Cardozo NSM, Marczak LDF, Guerreiro ICK. Pinhão starch and coat extract
307 as new natural cosmetic ingredients: Topical formulation stability and sensory analysis.
308 *Carbohydrate Polymers*, 134: 573–580, 2015.

309 Davidson L, Netea MG, Kullberg BJ. Patient Susceptibility to Candidiasis-A Potential for
310 Adjunctive Immunotherapy. *Journal of Fungi*, 4(1): 9, 2018.

311 Fukuda EK, Vasconcelos AFD, Matias AC, Barbosa AM, Dekker RFH, Da Silva MLC. Fungal cell
312 wall polysaccharides purification and characterization. *Semina: Ciências Agrárias*, 30(1): 117–134,
313 2009.

314 Gaba B, Fazil M, Khan S, Ali A, Baboota S, Ali J. Nanostructured lipid carrier system for topical
315 delivery of terbinafine hydrochloride. *Bulletin of Faculty of Pharmacy, Cairo University*, 53(2):
316 147–159, 2015.

317 Ghasemiyeh P, Mohammadi-Samani S. Solid lipid nanoparticles and nanostructured lipid carriers as
318 novel drug delivery systems: applications, advantages and disadvantages. *Research in*
319 *Pharmaceutical Sciences*, 13: 288–303, 2018.

320 Goyal R, Macri LK, Kaplan HM, Kohn J. Nanoparticles and nanofibers for topical drug delivery.
321 *Journal of Controlled Release*, 240: 77–92, 2016.

322 Guerreiro ICK, Bianchin MD, Poletto F, Prebianca G, Immich MF. 2018. Nanocarreador,
323 composição, processo de obtenção e uso do mesmo para a preparação de uma composição
324 farmacêutica, nutracêutica, cosmética ou com aplicação em agropecuária. BR 10 2018 067690 3,
325 2018.

326 Hernandez-Delgadillo R, Velasco-Arias D, Martinez-Sanmiguel JJ, Diaz D, Zumeta-Dabe I,
327 Arevalo-Niño K, Cabral-Romero C. Bismuth oxide aqueous colloidal nanoparticles inhibit *Candida*
328 *albicans* growth and biofilm formation. *International Journal of Nanomedicine*, 8: 1645–1652,
329 2013.

330 Hussain A, Samad A, Singh SK, Ahsan MN, Haque MW, Faruk A, Ahmed FJ. Nanoemulsion gel-
331 based topical delivery of an antifungal drug: In vitro activity and in vivo evaluation. *Drug Delivery*,
332 23(2): 652–667, 2016.

333 Jabra-Riszk MA, Kong EF, Tsui C, Nguyen MH, Clancy CJ, Fidel PL, Noverr M. *Candida albicans*
334 Pathogenesis: Fitting within the Host-Microbe Damage Response Framework. *American Society*

335 *For Microbiology*, 84(10): 2724-2739, 2016.

336 Katke SA, Amrutkar SV, Bhor RJ, Khairnar MV. Synthesis of biologically active 2-chloro-N-
337 alkyl/aryl acetamide derivatives. *International Journal of Pharma Sciences and Research*, 2(7):
338 148–156, 2011.

339 Lana DFD, Batista BG, Alves SH, Fuentefria AM. Dermatophytoses: etiologic agentes, clinical
340 forms, therapy and new perspectives of treatment. *Clinical & Biomedical Research*, 36(4): 230-241,
341 2016.

342 Lavorato SN, Duarte MC, Andrade PHR, Coelho EAF, Alves RJ. Synthesis, Antileishmanial
343 activity and QSAR studies of 2-chloro-N-arylacetamides. *Brazilian Journal of Pharmaceutical
344 Sciences*, 53(1): 1–7, 2017.

345 Moazeni M, Asgari S, Nabili M. Nosocomial fungal infections: Epidemiology, diagnosis, treatment
346 and prevention. *Journal of Mazandaran University of Medical Sciences*, 27(160): 182–212, 2018.

347 Pianalto K, Alspaugh J. New Horizons in Antifungal Therapy. *Journal of Fungi*, 2(4), 26, 2016.

348 Pippi B, Reginatto P, Machado GRM, Bergamo VZ, Lanna DFD, Teixeira ML, Franco LL, Alves
349 RJ, Andrade SF, Fuentefria AM. Evaluation of 8-Hydroxyquinoline Derivatives as Hits for
350 Antifungal Drug Design. *Medical Mycology*, 55(7): 763–773, 2017.

351 Tian B, Yan Q, Wang J, Ding C, Sai S. Enhanced antifungal activity of voriconazole-loaded
352 nanostructured lipid carriers against *Candida albicans* with a dimorphic switching model.
353 *International Journal of Nanomedicine*, 12: 7131–7141, 2017.

354 Voltan AR, Quindós G, Alarcón KPM, Fusco-Almeida AM, Mendes-Giannini MJS, Chorilli M.
355 Fungal diseases: Could nanostructured drug delivery systems be a novel paradigm for therapy?
356 *International Journal of Nanomedicine*, 11: 3715–3730, 2016.

357 Whaley SG, Berkow EL, Rybak JM, Nishimoto AT, Barker KS, Rogers PD. Azole Antifungal
358 Resistance in *Candida albicans* and Emerging Non-*albicans* *Candida* Species. *Frontiers in*
359 *Microbiology*, 7: 2173, 2017.

FIGURAS E TABELAS

Figura 1. Perfil de distribuição de tamanho dos anfissomas por volume (A) e número (B).

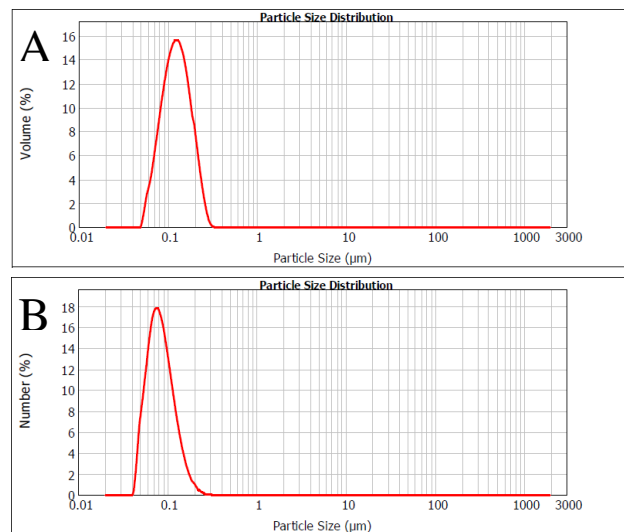


Tabela 1. Caracterização físico-química do anfissoma (média \pm dp).

Parâmetro	Resultado
pH	4,87 \pm 0,22
Teor (%)	101,31 \pm 0,81
D [4,3] por volume (nm)	131 \pm 0,0007
Span por volume	0,966 \pm 0,002
D [4,3] por número (nm)	131 \pm 0,000
Span por número	0,942 \pm 0,000
d(Z-average) (nm)	115,05 \pm 4,31
PDI	190 \pm 0,027
Potencial Zeta (mV)	2,885 \pm 1,80

Tabela 2. Avaliação de estabilidade do anfissoma (média \pm dp).

Parâmetro	0 dias	7 dias	15 dias	30 dias
pH	4,86 \pm 0,22	4,61 \pm 0,042	4,96 \pm 0,31	4,62 \pm 0,21
Teor (%)	101,31 \pm 0,81	65,05 \pm 3,11	64,58 \pm 2,10	64,22 \pm 4,96
D [4,3] _(v) (nm)	130 \pm 0,0007	130 \pm 0,001	143 \pm 0,02	130 \pm 0,003
Span _(v)	0,966 \pm 0,002	1,067 \pm 0,26	1,119 \pm 0,16	1,117 \pm 0,19
D [4,3] _(n) (nm)	131 \pm 0,000	131 \pm 0,000	132 \pm 0,006	131 \pm 0,001
Span _(n)	0,942 \pm 0,000	1,057 \pm 0,27	1,072 \pm 0,19	1,094 \pm 0,21
Aspecto	Esbranquiçada	Esbranquiçada	Esbranquiçada	Esbranquiçada

Tabela 3. Valores de concentração inibitória mínima (μ g/mL) obtidos para os anfissomas contendo o composto CBr e para o composto livre, frente a cepas leveduriformes e dermatofíticas.

Cepas	NCBr	CBr
MCA 01	25	50
MGY 58	12,5	25
TME 60	25	25
TRU 45	25	50
TRU 51	6,25	6,25
MGY 50	12,5	12,5
MCA 29	12,5	25
CA ATCC 18804	50	50
CP RL 38	50	50
CK RL 52	50	50
CT 94 P	50	50

NCBr: anfissoma contendo o composto CBr; CBr: derivado de cloroacetamidas na forma livre. Concentração testada para o anfissoma e para o composto livre: 400 μ g/mL. *Candida albicans*: ATCC 18804; *C. krusei*: CK RL52; *C. parapsilosis*: CP RL38; *C. tropicalis*: CT 94P. *Microsporum canis* (MCA 01 e MCA 29), *M. gypseum* (MGY 50 e MGY 58), *Trichophyton mentagrophytes* (TME 60) e *T. rubrum* (TRU 45 e TRU 51).

ANEXOS

Anexo A. Normas da Revista Brasileira de Farmácia.

INSTRUÇÕES GERAIS

Todos os manuscritos devem ser originais e não publicados anteriormente. Cabe salientar que submissão simultânea implicará em sua recusa nesse periódico. As publicações em inglês e espanhol devem ser revisadas por um profissional de edição de língua estrangeira e não garantem o aceite do artigo. **O custo da revisão do texto em inglês ou espanhol é de responsabilidade dos autores que são encorajados a buscar profissionais ou empresas qualificados.**

A RBF reserva os direitos de submeter todos os manuscritos para revisores *ad hoc*, cujos nomes serão confidenciais e com autoridade para decidir a aceitação ou declínio da submissão. Nos casos de conflito de avaliações entre os pares, não se compromete a seguir com uma terceira avaliação, a decisão contará com avaliação dos pareceres pelo Conselho Editorial.

FORMA E APRESENTAÇÃO DOS MANUSCRITOS

A RBF aceita artigos para as seguintes seções:

- a) Artigos originais ou de revisão (**até 7.000 palavras, incluindo notas e referências, e exclui o Resumo/Abstract. Máximo de 5 figuras, quadro/gráfico ou tabela**): textos inéditos provenientes de pesquisa ou análise/revisão bibliográfica. A publicação é decidida pelo Conselho Editorial, com base em pareceres - respeitando-se o anonimato tanto do autor quanto do parecerista (*double-blind peer review*) - e conforme disponibilidade de espaço.
- b) Artigos originais por convite (**até 8.000 palavras, incluindo notas e referências, e exclui o Resumo/abstract. Máximo de 5 figuras, quadro/gráfico ou tabela**): textos inéditos de temas previamente solicitados pelo editor (a) Chefe ou Conselho Editorial a autores/pesquisadores de reconhecida experiência no campo das Ciências Farmacêuticas, que poderão resultar em artigos resultado de pesquisa ou de revisão. Os artigos originais serão publicados com base em pareceres (*double-blind peer review*). Apenas artigos que, devido a seu caráter autoral, não podem ser submetidos anonimamente a um parecerista, serão analisados, com ciência do autor, com base em pareceres em que só o parecerista é anônimo (*single-blind peer review*).
- c) **Resumo de Tese de Doutorado ou Dissertações de Mestrado (até 1500 palavras, incluindo notas e referências. Máximo de 3 figuras, tabela ou quadro/gráfico)**: Trata-se de um Resumo ampliado de estudos acadêmicos que tenham relevância no campo das Ciências farmacêuticas. Serão aceitos os Resumos de pesquisas que tenham sido defendidas até dois anos antes da

publicação da RBF. O número de Resumos não poderá ultrapassar 15% do total de artigos apresentados por edição, e deverá contemplar as seções Introdução, Metodologia, Resultados e Discussão e Conclusão de forma resumida.

ALGUMAS CONSIDERAÇÕES PRÉVIAS

- a) Deverá ser adotado o **Sistema Internacional** (SI) de medidas.
- b) As equações necessárias a compreensão do texto deverão ser editadas utilizando *software* compatível com o editor de texto. As variáveis deverão ser identificadas após a equação.
- c) Recomenda-se que os autores realizem a análise de regressão ou outro teste estatístico aplicável para fatores quantitativos, mas que a utilização de programas específicos para o tratamento dos dados estatísticos deve constar da seção de Metodologia.
- d) **ATENÇÃO: QUADROS/ TABELAS, GRÁFICOS E FIGURAS devem ter largura de no máximo 8,25 cm, com alta resolução e enviados em arquivo separado. Nesse caso, sua posição deve ser identificada no texto. CASO CONTRÁRIO, O MANUSCRITO SERÁ DEVOLVIDO AOS AUTORES, que acarretará em nova submissão.**
- e) A RBF recomenda a utilização de Referencias Bibliográficas atualizada, salvo aquelas consagradas em trabalhos de autores seminais de cada área específica, ou ainda em textos que necessitam de informações históricas relevantes na compreensão da argumentação apresentada. Consideraremos atualizadas aquelas com data de publicação em periódicos indexados a pelo menos 5 anos da data de envio do manuscrito.
- f) **TODAS as correções sugeridas durante o processo de submissão deverão ser destacadas em VERMELHO, e devolvida a comissão editorial pelo endereço: revistabrasileiradefarmacia@yahoo.com.br.**

FORMATAÇÃO DO TEXTO

Os manuscritos deverão utilizar aplicativos compatíveis com o **Microsoft Word**. Devem ser escritos em página formato A4 com margens de 2 cm, espaçamento duplo, fonte Times New Roman, tamanho 12, justificado. As linhas e páginas devem ser numeradas a partir do Título até a página final.

Deve-se adotar no texto apenas as **abreviações padronizadas**. Por exemplo: Kg (quilograma)

A primeira citação da abreviatura entre parênteses deve ser precedida da expressão correspondente por extenso. Por exemplo: Agencia Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA).

O **recurso de itálico** deverá ser adotado apenas para realmente destacar partes importantes do texto, como por exemplo, citações *ipsis literis* de autores consultados, partes de depoimentos, entrevistas transcritas, nomes científicos de organismos vivos e termos estrangeiros.

As ilustrações, figuras, esquemas, tabelas e gráficos deverão ser identificadas no texto, conforme apresentação desejada pelo autor, e **apresentadas em arquivo separado.**

Os manuscritos deverão seguir a seguinte estrutura:

- **Título:** deverá ser conciso **e não** ultrapassar 30 palavras, informativo, digitado em negrito com letras minúsculas utilizando a fonte *Times New Roman* (tamanho 14), com exceção da primeira letra, dos nomes próprios e/ou científicos.
- **Autores:** deverão ser adicionados a um espaço abaixo do título, centralizados, separados por vírgula. O símbolo “&” deve ser adicionado antes do último autor (Ex.: Paulo da Paz, João de Deus & Pedro Bondoso). Inserir os nomes completos dos autores, por extenso, com letras minúsculas com exceção da primeira letra de cada nome.
- **Afiliação do autor:** cada nome de autor deverá receber um **número arábico** sobrescrito indicando a instituição na qual ele é afiliado. A lista de instituições deverá aparecer imediatamente abaixo da lista de autores. O nome do autor correspondente deverá ser identificado com um asterisco sobrescrito. O e-mail institucional, endereço completo, CEP, telefone e fax do autor correspondente deverão ser escritos no final da primeira página.
- **Resumo (Abstract):** deverá ser escrito na **segunda página** do manuscrito, não deverá exceder 200 palavras, deverá conter informações sucintas que descrevam **objetivo da pesquisa, metodologia, discussão/resultados e a conclusão.** Os manuscritos escritos em português ou em espanhol devem ter um Resumo traduzido para o inglês (Abstract). O Abstract deve ser digitado na **terceira página** do manuscrito e deve ser revisado por um profissional de edição de língua inglesa. **Os manuscritos em inglês deverão apresentar um Resumo em português.**
- **Palavras-chave (Keywords):** são fundamentais para a classificação da temática abordada no manuscrito em bancos de dados nacionais e internacionais. Serão aceitas entre 3 e 5 palavras-chave. Após a seleção, sua existência em português e inglês deve ser confirmada pelo(s) autor (es) do manuscrito no endereço eletrônico <http://decs.bvs.br> (Descritores em Ciências da Saúde - Bireme). As palavras-chave (Keywords) deverão ser separadas por **vírgula** e a **primeira letra** de cada palavra-chave deverá maiúscula.
- **Introdução:** Situa o leitor quanto ao tema que será abordado e apresenta o problema de estudo, destaca sua importância e lacunas de conhecimento (justificativa da investigação), e inclui ainda os **objetivos** (geral e específico) a que se destina discutir.

- **Metodologia ou Percurso Metodológico:** Nessa seção o autor (es) deve (m) apresentar o percurso metodológico utilizado que apresente o tipo de estudo (se qualitativo ou quantitativo), de base empírica, experimental ou de revisão de forma que identifique a natureza/tipo do estudo. São fundamentais os dados sobre o local onde foi realizada a pesquisa; população/sujeitos do estudo e seus critérios de seleção (inclusão e exclusão) e cálculo amostral. Nos casos de pesquisa experimental cabe a identificação do material, métodos, equipamentos, procedimentos técnicos e métodos adotados para a coleta de dados.

Na apresentação do tratamento estatístico/categorização dos dados cabe informar a técnica ou programa utilizado no tratamento e análise. Nos casos de investigação com humanos ou animais cabe informar a data e o número do protocolo da aprovação pelo Comitê de Ética em Pesquisa.

Quanto ao estudo de espécies vegetais deve ter a indicação do seu local de coleta (dados de GPS), o país de origem, o responsável pela identificação da espécie e o depósito da exsicata.

- **Resultados e Discussão:** devem ser apresentados de maneira clara, objetiva e em sequência lógica, utilizando ilustrações (figuras, quadros e tabelas) quando necessário. Deve-se comparar com informações da literatura sobre o tema ressaltando-se aspectos novos e/ou fundamentais, as limitações do estudo e a indicação de novas pesquisas. Nessa seção cabe a análise e discussão crítica da pesquisa.
- **Conclusões:** apresentar considerações significativas fundamentadas nos resultados encontrados e vinculadas aos objetivos do estudo.
- **Agradecimentos:** opcional e deverá aparecer antes das referências.
- **Figuras, Quadro/Tabelas ou Gráficos:** Todas as ilustrações devem apresentar um título breve na parte superior e numerada consecutivamente com algarismos arábicos, conforme a ordem em que forem citadas no manuscrito e a legenda com fonte em Times New Roman, tamanho 12, justificado e com largura máxima de 8,25 cm.

As Tabelas devem apresentar dados numéricos como informação central, e não utilizar traços internos horizontais ou verticais. As notas explicativas devem ser colocadas no rodapé da tabela, com os seus respectivos símbolos. **Se houver ilustração extraída de outra fonte, publicada ou não, a fonte original deve ser mencionada abaixo da tabela.** Não é permitida a utilização de Figura, gráfico, quadro/tabela publicada em outro periódico **sem antes pedir autorização prévia dos autores e/ou da revista.**

Qualquer uma dessas ilustrações com baixa resolução poderá ser excluída durante o processo de diagramação da RBF, ou ainda comprometer o aceite do manuscrito.

As fotos deverão garantir o anonimato de qualquer indivíduo que nela constar. Caso os autores queiram apresentar fotos com identificação pessoal, deverão apresentar permissão específica e escrita para a publicação das mesmas.

- **Referências:**

As citações bibliográficas deverão ser adotadas de acordo com as exigências da RBF. Citação no texto, usar o sobrenome e ano: Lopes (2005) ou (Lopes, 2005); para dois autores (Souza & Scapim, 2005); três autores (Lima, Pereira & Silva, 2008), para mais do que quatro autores, utilizar o primeiro autor seguido por *et al.* (Wayner *et al.*, 2007), porém na lista de referências deverão aparecer ordenadas alfabeticamente pelo **sobrenome do primeiro autor**. A citação de mais que uma referência por parágrafo requer a ordenação em ordem decrescente cronológica e cada grupo de autores separados por “ponto e vírgula”. Por exemplo: (Gomes & Souza, 2012; Mendez, 2010; Lima, Pereira & Silva, 2008).

A veracidade das referências é de responsabilidade dos autores. Os exemplos de referências citados abaixo foram adaptados, em sua maioria, do documento original da ABNT (NBR 6023, agosto de 2002).

a) Artigos de periódicos:

A abreviatura do periódico deverá ser utilizada, em itálico, definida no Chemical Abstracts Service Source Index (<http://www.cas.org/sent.html>) ou na Base de dados PubMed, da US National Library of Medicine (<http://www.pubmed.gov>), selecionando Journals Database. Caso a abreviatura autorizada de um determinado periódico não puder ser localizada, deve-se citar o título completo.

Autor (es)*. *Título do periódico em itálico*, volume (a indicação do fascículo é entre parênteses): páginas inicial - final do artigo, ano de publicação.

Galato D & Angeloni L. A farmácia como estabelecimento de saúde sob o ponto de vista do usuário de medicamentos. *Rev. Bras. Farm.* 90(1): 14 – 18, 2009.

Fonseca VM, Longobuco P, Guimarães EF, Moreira DL, Kaplan MAC. Um teste do formato de nome. *Rev. Bras. Farm.* 90(1): 14 – 18, 2009.

b) Livros:

- **Com 1 autor**

Autor. Título. Edição (a partir da 2a). Cidade: Editora, ano de publicação. Número total de páginas.

Casciato DA. Manual de oncologia clínica. São Paulo: Tecmed, 2008. 1136 p.

- **Com 2 autores**

Lakatos EM & Marconi MA. Metodologia científica. 2. ed. São Paulo: Atlas, 1991. 231 p.

- **Com autoria corporativa**

Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos. I Fórum Nacional de Educação Farmacêutica: O farmacêutico de que o Brasil necessita (Relatório Final). Brasília, DF, 2008. 68p.

- **Capítulos de livros (o autor do capítulo citado é também autor da obra):**

Autor (es) da obra. Título do capítulo. *In:* _____. Título da obra. Cidade: Editora, Ano de publicação. Capítulo. Paginação da parte referenciada.

Rang HP, Dale MM & RITTER JM. *In:* Quimioterapia do câncer. Farmacologia. 5. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2004. cap. 50, p. 789-809.

- **Capítulos de livros (o autor do capítulo citado não é o autor da obra):**

Autor (es) do capítulo. Título da parte referenciada. *In:* Autor (es) da obra (ou editor) Título da obra. Cidade: Editora, Ano de publicação. Capítulo. Paginação da parte referenciada.

Schenkel EP, Gosmann G & Petrovick PR. Produtos de origem vegetal e o desenvolvimento de medicamentos. *In:* Simões CMO. (Org.). Farmacognosia: da planta ao medicamento. 5. ed. Porto Alegre: Editora da UFRGS; Florianópolis: Editora da UFSC, 2003. cap. 15, p. 371-400.

- **Citação indireta**

Utiliza-se *apud* (citado por) nas citações que foram transcritas de uma obra de um determinado autor, mas que na verdade pertence a outro autor.

Helper CD & Strant LM. Opportunities and responsibilities in pharmaceutical care. *Am. J. Hosp. Pharm.* 47: 533-543, 1990. *Apud* Bisson MP. Farmácia Clínica & Atenção Farmacêutica. 2. ed. Barueri: Manole, 2007. p. 3-9.

c) Teses, Dissertações e demais trabalhos acadêmicos:

Autor. *Título* (inclui subtítulo se houver). Ano. Cidade. Total de páginas. Tipo (Grau), Instituição (Faculdade e Universidade) onde foi defendida.

Sampaio IR. *Etnofarmacologia e toxicologia de espécies das famílias Araceae e Euphorbiaceae*. 2008. Rio de Janeiro. 45 p. Monografia (Especialização em Farmacologia), Associação Brasileira de Farmacêuticos. Rio de Janeiro.

d) Eventos científicos (Congressos, Seminários, Simpósios e outros):

Autor (es). Título do trabalho. *Nome do evento*, nº do evento. Página. Cidade. País. Ano. Marchioretto CT, Junqueira MER & Almeida ACP. Eficácia anestésica da neocaína (cloridrato de bupivacaína associada a epinefrina) na duração e intensidade da anestesia local em dorso de cobaio. *Reunião anual da SBPC*, 54, Goiânia, Brasil, 2002.

e) Patentes: Devem ser identificadas conforme modelo abaixo e na medida do possível o número do Chemical Abstracts deve ser informado.

Ichikawa M, Ogura M & Lijima T. 1986. Antiallergic flavone glycoside from *Kalanchoe pinnatum*. *Jpn. Kokai Tokkyo Koho JP 61,118,396,apud* Chemical Abstracts 105: 178423q.

f) Leis, Resoluções e demais documentos

Conforme o modelo:

Brasil. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução de Diretoria Colegiada (RDC) no 44, de 17 de agosto de 2009.

g) Banco/Base de Dados

Conforme o modelo

BIREME. Centro Latino-Americano e do Caribe de Informação em Ciências da Saúde. Lilacs - Literatura Latino-Americana e do Caribe em Ciências da Saúde. Disponível em: <<http://bases.bireme.br/cgi-bin/wxislind.exe/iah/online/?IsisScript=iah/iah.xis&base=LILACS&lang=p>>. Acesso em: 27 ago. 2009.

h) Homepage/Website

Conforme o modelo:

WHO *Guidelines for Pharmacological Management of Pandemic (H1N1) 2009 Influenza and other Influenza Viruses*. 91 p. Disponível em: <http://www.who.int/csr/resources/publications/swineflu/h1n1_guidelines_pharmaceutical_mngt.pdf>. Acesso em agosto de 2009.