

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE FARMÁCIA
TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO

OBTENÇÃO DE SISTEMAS NANOMÉTRICOS CONTENDO ÓLEO
OZONIZADO COM POTENCIAL ATIVIDADE FRENTE A DERMATÓFITOS

KIANY DE OLIVEIRA FIRMINO

PORTO ALEGRE
2019

KIANY DE OLIVEIRA FIRMINO

OBTENÇÃO DE SISTEMAS NANOMÉTRICOS CONTENDO ÓLEO
OZONIZADO COM POTENCIAL ATIVIDADE FRENTE A DERMATÓFITOS

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado ao Curso de Farmácia da
Universidade Federal do Rio Grande do
Sul, como requisito parcial para a obtenção
do título de Farmacêutica

Orientadora: Profa. Dra. Renata Vidor
Contri

Coorientadora: Msc. Morgana Souza
Marques

PORTO ALEGRE

2019

APRESENTAÇÃO

Os resultados obtidos no presente trabalho, intitulado “OBTENÇÃO DE SISTEMAS NANOMÉTRICOS CONTENDO ÓLEO OZONIZADO COM POTENCIAL ATIVIDADE FRENTE A DERMATÓFITOS”, serão apresentados na sequência, em forma de artigo científico, como requisito parcial para fins de conclusão do curso de Farmácia na Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS). Este será posteriormente submetido para publicação na revista INFARMA - CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS e já se encontra formatado com relação às normas da revista (Anexo).

OBTENÇÃO DE SISTEMAS NANOMÉTRICOS CONTENDO ÓLEO

OZONIZADO COM POTENCIAL ATIVIDADE FRENTE A

DERMATÓFITOS

NANOMETRIC SYSTEMS CONTAINING OZONATED OIL WITH POTENTIAL

ACTIVITY AGAINST DERMATOPHYTES

Kiany de Oliveira Firmino¹, Morgana Souza Marques², Francielli Lima dos Santos¹,

Bárbara Souza da Costa³, Alexandre Meneghello Fuentesfria^{1,2,3}, Irene Clemes

Külkamp-Guerreiro^{1,2}, Renata Vidor Contri^{1,2*}

¹Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 90610-000, Porto Alegre, RS, Brasil.

²Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 90610-000, Porto Alegre, RS, Brasil.

³Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola e do Meio Ambiente, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 90610-000, Porto Alegre, RS, Brasil.

*Autor correspondente: Tel.: +55 (51) 3308-5416. E-mail: renata.contri@ufrgs.br (R. V. Contri).

OBTENÇÃO DE SISTEMAS NANOMÉTRICOS CONTENDO ÓLEO

OZONIZADO COM POTENCIAL ATIVIDADE FRENTE A

DERMATÓFITOS

NANOMETRIC SYSTEMS CONTAINING OZONATED OIL WITH POTENTIAL

ACTIVITY AGAINST DERMATOPHYTES

RESUMO

Este trabalho teve como objetivo desenvolver e caracterizar nanoemulsões e nanocápsulas contendo óleo de girassol ozonizado para aplicação na pele, com potencial atividade antifúngica frente a dermatófitos. As formulações foram obtidas por técnicas de deposição interfacial do polímero pré-formado e emulsificação espontânea seguida de ultra-turrax, respectivamente. Inicialmente, os parâmetros para a síntese da nanoemulsão foram estabelecidos através de testes preliminares, no qual a associação de dois tensoativos (polissorbato 80 e monooleato de sorbitano), a utilização do equipamento ultra-turrax e o emprego do período de 1h de pausa após 40 minutos de processamento foram os parâmetros escolhidos como os mais adequados. Os sistemas nanométricos foram avaliados em termos das propriedades organolépticas, físico-químicas, presença de ozônio e atividade antifúngica. A estabilidade das mesmas foi analisada por centrifugação e de forma preliminar após 30 dias em estufa (40 °C) e geladeira (4 °C). Ambas formulações se apresentaram brancas e homogêneas, com odor característico do óleo ozonizado. Os diâmetros médios e valores de pH foram, respectivamente, de $139 \pm 7,6$ nm e $3,2 \pm 0,1$ para a nanoemulsão, e $149 \pm 6,1$ nm e $3,3 \pm 0,2$ para as nanocápsulas. Todas as formulações continham ozônio confirmado por infravermelho e foram consideradas estáveis. Testes de suscetibilidade foram realizados utilizando dois isolados de dermatófitos, *Trichophyton rubrum* e *Microsporum canis*, sendo que os sistemas demonstraram atividade inibitória do crescimento das espécies. As nanocápsulas mostraram-se mais potentes com concentração inibitória mínima menor (0,7812 mg/mL) em comparação à nanoemulsão (1,5625 mg/mL). Dessa forma, as formulações desenvolvidas podem ser consideradas potenciais terapias alternativas ao uso de antifúngicos tradicionais.

Palavras-chave: nanopartículas; ozônio; microsporum; trichophyton.

ABSTRACT

This work aimed to develop and characterize nanoemulsions and nanocapsules containing ozonized sunflower oil for skin application, with potential antifungal activity against dermatophytes. The formulations were obtained by interfacial deposition of preformed polymer and spontaneous emulsification followed by ultra-turrax, respectively. Initially, the parameters for the nanoemulsion synthesis were determined through preliminary tests, in which the association of two surfactants (polysorbate 80 and sorbitan monooleate), the use of ultra-turrax equipment and a 1h interval after 40 minutes of processing were the parameters chosen as the most appropriate. Nanometric systems were evaluated in terms of organoleptic, physicochemical properties, ozone presence and antifungal activity. Stability was analyzed by centrifugation and, preliminary, after 30 days in oven (40 °C) and refrigerator (4 °C). Both formulations appeared white and homogeneous, with typical ozonated oil odor. The mean diameters and pH values were, respectively, 139 ± 7.6 nm and 3.2 ± 0.1 for nanoemulsion and 149 ± 6.1 nm and 3.3 ± 0.2 for nanocapsule. Susceptibility tests were performed using two dermatophyte isolates, *Trichophyton rubrum* and *Microsporum canis*, and the systems demonstrated inhibitory activity of specie's growth. The nanocapsule was more potent with lower Minimum Inhibitory Concentration (0.7812 mg/mL) compared to the nanoemulsion (1.5625 mg/mL). Thus, the developed formulations may be considered potential alternative therapies to the use of traditional antifungals.

Key-words: nanoparticles; ozone; microsporum; trichophyton.

1. INTRODUÇÃO

A nanotecnologia tem sido grande alvo de pesquisas na área cosmética e dermatológica nos últimos anos, fato que é resultante das inúmeras vantagens associadas à ela, tais como: conservação das propriedades de ativos (1) liberação gradual e controlada dos mesmos, aumento na estabilidade e eficácia de formulações (2, 3), espalhabilidade mais adequada sobre a pele (4), modulação da permeação cutânea (2), além da melhoria nas características organolépticas, como odor indesejado (5, 6). As nanopartículas mais utilizadas na área cosmética e dermatológica são classificadas em nanocápsulas, nanoesferas, nanopartículas lipídicas sólidas, nanoemulsões, microemulsões, lipossomas e niossomas (4), sendo que as nanocápsulas e as nanoemulsões são apropriadas para a veiculação de óleos.

Nanocápsulas e nanoesferas poliméricas são partículas poliméricas que se diferenciam quanto à sua estrutura. As nanocápsulas são sistemas que possuem um núcleo envolto por um manto polimérico. As substâncias de interesse são depositadas nessa vesícula a qual pode ter caráter lipofílico ou hidrofílico, dependendo do tipo de ativo de encapsulação de interesse. Considera-se as nanocápsulas como um “reservatório” de tamanho variando de 10 a 1000 nm (1). Esses sistemas podem controlar a penetração da substância encapsulada pois possuem a capacidade de formar um filme de proteção na superfície da pele (4). Além disso, ao entrar em contato com a pele, não perde a sua estrutura, como observado para as nanopartículas lábeis, como as lipídicas (2).

As nanopartículas lipídicas são as mais regularmente utilizadas considerando aplicação tópica, e entre elas, as mais comuns são as nanopartículas lipídicas sólidas e nanoemulsões (7). As nanoemulsões apresentam-se como dispersões monofásicas

límpidas, compostas por tensoativo, óleo e água nas suas devidas proporções e com tamanho de partícula inferior a 100 nm (8). São formulações relativamente simples e baratas e a sua eficácia na liberação cutânea de ativos vem sendo pesquisada (8). A modulação do transporte através da pele feita pela nanoemulsão varia conforme o caráter do sistema nanoemulsionado (9). Objeto de grande interesse cosmético, as nanoemulsões são capazes de reduzir a perda transepidérmica de água, além de possuírem, para aplicação tópica, uma viscosidade adequada uma vez que o tamanho reduzido das partículas diminui fenômenos como floculação, coalescência e sedimentação (10).

Na obtenção de produtos cosméticos e dermatológicos, diversos ativos podem ser nanoencapsulados apresentando vantagens considerando cuidados com a pele, unhas e cabelo e tratamento de patologias. O uso da nanotecnologia surge como uma alternativa para a melhoria da eficácia da terapia antifúngica, uma vez que pode diminuir os efeitos colaterais dos mesmos e concentrar no local de ação o ativo desejado (11). Flores e colaboradores (2011) desenvolveram suspensões de nanocápsulas poliméricas e nanoemulsões contendo o óleo essencial de *Melaleuca alternifolia* e avaliou seu potencial antifúngico em *Candida albicans* e *Trichophyton rubrum*. As nanoestruturas apresentaram potencial de controle de crescimento e inibição dos microrganismos, obtendo-se resultados promissores como terapia antifúngica alternativa (12). Motedayen e colaboradores (2018) compararam o efeito de um antifúngico (terbinafina) e o mesmo incorporado em lipossomas frente a isolados *Trichophyton rubrum* e *Microsporum canis* através da avaliação das concentrações inibitórias mínimas dos mesmos. As nanopartículas de terbinafina apresentaram atividade antifúngica superior ao fármaco não nanoencapsulado, indicando um potencial tratamento de dermatofitoses (13).

Sabe-se que, a longo prazo, alguns antifúngicos apresentam efeitos colaterais indesejáveis, despertando a necessidade pela busca de tratamentos alternativos (11). Além disso, muitos medicamentos antifúngicos disponíveis são ineficazes e apresentam dificuldade de atravessar o estrato córneo (11). Neste contexto surge a ideia da utilização do ozônio como agente antifúngico, pois este possui a capacidade de interagir com moléculas presentes nos ácidos graxos dos óleos, e produzir compostos tóxicos chamados ozonídeos. Estes interagem com componentes celulares passíveis de oxidação (ligações duplas, grupos sulfidrilas e anéis fenólicos) resultando em danos celulares além de perda das funções vitais das células dos microrganismos (15, 16). Ainda, o ozônio pode promover uma melhora na cicatrização de tecidos, aumentando a ingestão de oxigênio e contribuindo para a melhora da função celular (11, 16). Entretanto, devido a sua rápida instabilidade, alternativas como a ozonização de óleos vegetais são propostas (17, 18, 19). O óleo vegetal mais usado é óleo de oliva, sendo também utilizados outros óleos como o óleo de girassol (18). Ouf e colaboradores (2015) avaliaram a eficácia antifúngica de um óleo ozonizado em comparação ao ozônio gasoso, sendo que o óleo se mostrou mais potente contra alguns dermatófitos comuns (15).

A aplicação de óleos na pele pode ser facilitada através de um sistema nanométrico, de forma a aumentar a estabilidade e a homogeneidade do sistema, reduzindo a oleosidade na pele (7). O desenvolvimento e avaliação de nanoemulsões de óleo de oliva ozonizado foram descritas (17). A proporção entre tensoativo e óleo, o tipo de tensoativo e sua concentração e a velocidade de agitação (método de baixa energia) foram os parâmetros variados e analisados. Obteve-se, dessa forma, nanoemulsões com 1,5% de óleo ozonizado, pequeno tamanho de partícula (213 nm) e alta estabilidade utilizando-se o tensoativo polissorbato 40 a 750 rpm. A formulação

apresentou atividade antimicrobiana contra *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*. Não existem relatos até o momento da obtenção de sistemas nanométricos a partir de óleos ozonizados visando a terapia antifúngica.

Portanto, o objetivo do presente trabalho foi desenvolver e caracterizar uma nanoemulsão e uma suspensão de nanocápsulas, através de métodos *top down* e *bottom up*, respectivamente, contendo óleo de girassol ozonizado e avaliar o potencial antifúngico das formulações nanométricas inovadoras em culturas de fungos dermatófitos.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 MATERIAIS

O Eudragit RS 100[®] foi obtido da empresa Evonik Industries. O polissorbato 80 (P80) e o monooleato de sorbitano (MS) foram fornecidos pela empresa Dinâmica Química Contemporânea Ltda. A acetona grau PA e o dimetilsulfóxido (DMSO) foram providos das empresas Neon e Nuclear, respectivamente. O óleo de girassol ozonizado foi adquirido da empresa Philozon, e os meios RPMI 1640 e ágar Sabouraud da empresa Kasvi.

2.2 MÉTODOS

2.2.1 Obtenção da nanoemulsão

Nanoemulsão contendo óleo ozonizado (NE-OZ, 30 mL) foi obtida por meio do método *top down* através da emulsificação espontânea. Resumidamente, o P80 (3 g) ou a associação de P80 e MS (P80+MS; 1,125 g e 1,125 g) foi dissolvido em água ultrapura sob agitação magnética a 25 °C a fim de obter a fase aquosa. Após, a fase

aquosa foi gotejada na fase orgânica composta de óleo ozonizado (1,5 g) sob agitação magnética a 25 °C. As concentrações de óleo e tipos de tensoativos utilizados nesse estudo foram baseados em estudo previamente publicado (20). A concentração de tensoativo foi de 7,5% pois é sabido que concentrações elevadas de tensoativo tendem a formar microemulsões (11). Seguido ao desenvolvimento da emulsão, o tamanho das gotículas foi reduzido empregando processos que demandam energia, como por exemplo, o ultra-turrax (IKA T10, velocidade 6) e o ultrassom de ponteira (QR350W, Ecosonics, 350 Watts), com o tempo de uso do equipamento de 40 minutos (4 ciclos de 10 minutos com pausa de 5 minutos entre cada ciclo) e em temperatura ambiente, conforme descrito em Tabela 1 (NE-OZ T1 até NE-OZ T4).

A partir da escolha da formulação mais adequada, em termos de distribuição de diâmetro, decidiu-se então, aprimorar a formulação. Parâmetros como o tempo de processamento (de 40 para 60 minutos) e temperatura de processamento (de temperatura ambiente para gelo ou temperatura ambiente com pausa) foram variados, de acordo com a Tabela 1 (NE-OZ T5 até NE-OZ T7). Todas as formulações foram armazenadas em frasco âmbar em temperatura ambiente até o momento dos ensaios.

Tabela 1. Obtenção da NE-OZ com otimização de parâmetros.

Formulações	Tensoativo	Equipamento	Tempo de agitação	Temperatura
NE-OZ T1	P80	Ultrassom de ponteira	40 min (4 ciclos de 10 min)	TA
NE-OZ T2	P80	Ultra-turrax	40 min (4 ciclos de 10 min)	TA
NE-OZ T3	P80+MS (1:1)	Ultrassom de ponteira	40 min (4 ciclos de 10 min)	TA
NE-OZ T4	P80+MS (1:1)	Ultra-turrax	40 min (4 ciclos de 10 min)	TA
NE-OZ T5	P80+MS (1:1)	Ultra-turrax	60 minutos (6 ciclos de 10 min)	TA
NE-OZ T6	P80+MS (1:1)	Ultra-turrax	60 minutos (6 ciclos de 10 min)	Banho de gelo
NE-OZ T7	P80+MS (1:1)	Ultra-turrax	60 minutos (6 ciclos de 10 min)	TA (com pausa de 1h após 40 min)

(P80: Polissorbato 80; MS: Monooleato de sorbitano; TA: Temperatura ambiente).

2.2.2 Obtenção das nanocápsulas poliméricas

A nanocápsula foi obtida baseada no método de deposição interfacial do polímero pré-formado, técnica *bottom up*, conforme descrito por Contri e colaboradores (2015) (7). Uma fase orgânica contendo acetona (100 mL), óleo ozonizado (500 mL) e polímero (Eudragit RS100[®]; 200 mg) foi vertida sobre uma fase aquosa, a qual é composta por P80 (152 mg) e 106 mL de água ultrapura a 25 °C. Após 10 minutos sob agitação magnética, o solvente orgânico foi evaporado em rotaevaporador e a suspensão foi concentrada até atingir o volume final de 10 mL, ajustado em balão volumétrico com água ultrapura. As nanocápsulas contendo óleo ozonizado foram chamadas de NC-OZ e armazenadas em frasco âmbar em temperatura ambiente até o momento dos ensaios.

2.2.3 Caracterização dos sistemas nanoestruturados

Análise macroscópica

As NE-OZ e NC-OZ foram caracterizadas após obtenção quanto aos parâmetros organolépticos. Cada formulação foi acondicionada em um béquer de vidro transparente e avaliada visualmente quanto ao aspecto, cor e odor (21).

Diâmetro de partícula

O tamanho de partícula (D(4,3)v) e distribuição de tamanho (Span) das NE-OZ e NC-OZ foi obtido através da técnica de difração de laser em um Mastersizer 2000 (Malvern Instruments, UK). As amostras foram diluídas em água ultrapura até atingir a obscuração necessária utilizando o índice de refração do óleo de girassol (1,47). O

diâmetro hidrodinâmico (Z average) e o índice de polidispersão (PDI) foi determinado por espalhamento de luz dinâmico usando um Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments Worcestershire, UK) a um ângulo de 173°. As amostras foram dispersas em água ultrapura em proporção de 1:500.

Potencial zeta

O potencial zeta das NE-OZ e NC-OZ após diluição (1:500) em solução de NaCl 10 nM previamente filtrada em membrana 0,45 µm foi determinado através da mobilidade eletroforética, utilizando o equipamento Zeta-sizer.

pH

As medidas de pH foram realizadas por análise direta em peagâmetro (DM22) previamente calibrado.

Densidade

Foi determinada utilizando um picnômetro de vidro, a 22 °C. O picnômetro vazio, bem como o mesmo com água e com as formulações foram pesados, afim de determinar a densidade relativa. A partir disso, foi possível obter a densidade de massa (20).

Espectroscopia de infravermelho- transformada de Fourier

A determinação da presença de ozônio no óleo de girassol ozonizado e nas formulações NE-OZ e NC-OZ foi realizada através da técnica de espectroscopia de infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR) em um espectrofotômetro de infravermelho (Spectrum BX FT-IR system Perkin Elmer), na faixa de 4000-400 cm^{-1} .

Estabilidade

A estabilidade das formulações foi avaliada em termos de pré-estabilidade, centrifugando a formulação a 15.000 rpm por 30 minutos, observando-se a presença de separação de fases das amostras (22). Também foram realizados ensaios de estabilidade preliminar, mantendo a formulação em câmara climática a 40 °C e 75% UR e em geladeira (4 °C) por 30 dias (22). Após o período de estabilidade, a NE-OZ e NC-OZ foram novamente avaliadas quanto ao Z average e PDI, pH e densidade pelos métodos previamente descritos.

2.2.4 Atividade antifúngica

Isolados fúngicos

Foram incluídos no estudo, 2 isolados das espécies de fungos dermatófitos mais prevalentes: *Trichophyton rubrum* e *Microsporum canis*. Os isolados estão depositados e registrados na Micoteca do Laboratório de Micologia Aplicada (GPMA) da Faculdade de Farmácia da UFRGS. Os ensaios e avaliações microbiológicas *in vitro* foram realizados no laboratório de Micologia Aplicada da UFRGS.

Teste de suscetibilidade a agentes antifúngicos

Os testes de suscetibilidade frente a NE-OZ e NC-OZ foram realizados. As concentrações inibitórias mínimas (CIM) foram determinadas pela técnica de microdiluição em caldo de acordo com o documento M38-A2 (CLSI, 2008). Diluições em série foram realizadas em triplicata com a utilização do meio RPMI 1640 e as concentrações foram obtidas na faixa de 50 mg/mL até 0,0976 mg/mL. A CIM foi estabelecida pela observação da inibição de 100% do crescimento visível do fungo após 5 dias de incubação a 35 °C.

2.2.5 Análise Estatística

As análises foram realizadas através de teste T de student, considerando $\alpha = 0,05$, utilizando Microsoft Excel.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Otimização da nanoemulsão contendo óleo ozonizado

Os testes, com objetivo de obter a nanoemulsão mais adequada, foram realizados em duas etapas, após cada etapa, as formulações foram avaliadas quanto à distribuição de tamanho por difração de laser. Após a obtenção das formulações NE-OZ (T1 a T4, Tabela 2 e Figura 1) observou-se que nanoemulsões contendo o P80 como tensoativo e desenvolvidas empregando o ultrassom como equipamento (NE-OZ T1), embora tenham apresentados resultados favoráveis quanto ao tamanho (nanométrico), apresentaram um Span elevado demonstrando uma falta da homogeneidade na

distribuição de tamanho de partícula. Da mesma forma, o emprego do ultra-turrax na síntese das mesmas formulações (NE-OZ T2) também não foi suficiente para o desenvolvimento de gotículas com diâmetro dentro do aceitável para uma administração tópica, com tamanhos de 3.040 nm. Contudo, adicionar mais de um tensoativo na composição das nanoemulsões (NE-OZ, T3 e T4), o MS, foi efetivo para reduzir o diâmetro médio e Span, independentemente do equipamento utilizado como observado na Figura 1.

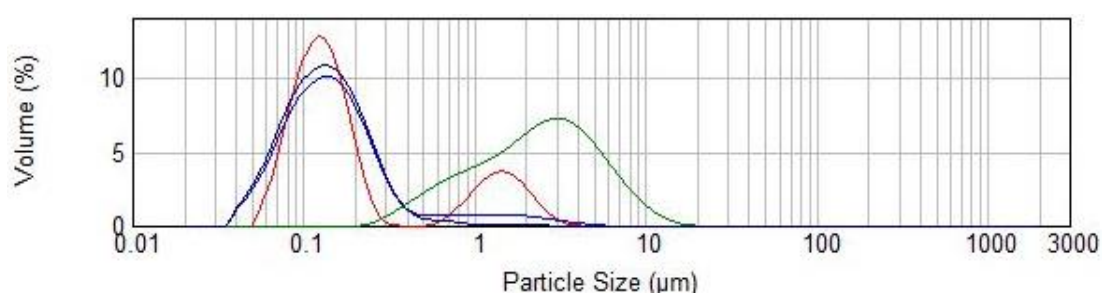


Figura 1. NE-OZ com variação de tensoativos e equipamento, NE-OZ T1 (linha vermelha); NE-OZ T2 (linha verde); NE-OZ T3 (linha azul); NE-OZ (linha preta).

Tabela 2. Análise de diâmetro das nanoemulsões desenvolvidas na primeira etapa de testes pela técnica de difração de laser

Formulações	D(4,3)v	Span
NE-OZ T1	445 nm	10,105
NE-OZ T2	3040 nm	2,350
NE-OZ T3	267 nm	2,254
NE-OZ T4	161 nm	1,509

Estudos recentes descrevem a obtenção de nanoemulsão através da técnica de ultrasonicação de ponteira (23, 24, 25). Esta técnica permite a obtenção de nanoformulações através de metodologia *top down*, sem o uso de solventes orgânicos, além de apresentar alta performance e boa versatilidade, sendo um método de grande

aplicação industrial (25). Entretanto, diferentemente do que foi relatado em tais estudos, para o presente trabalho, o equipamento ultra-turrax mostrou-se superior ao ultrassom de ponteira. Conforme os resultados apresentados anteriormente, a formulação NE-OZ T4 (P80+SM e ultra-turrax) apresentou melhor desempenho nas características mais adequadas para um sistema nanométrico, em termos de diâmetro médio e amplitude de distribuição granulométrica apresentando menor resultado de $D(4,3)v$ e Span quando comparada com a formulação NE-OZ T3 (P80+SM e ultrassom de ponteira). Godoy e colaboradores (2017) também utilizaram o ultra-turrax no preparo de nanoemulsões contendo óleo de *Eucalyptus globulus*. Este é um equipamento de manuseio simples, porém bastante eficiente para o preparo de nanoemulsões (20).

Dentre essas formulações, a que apresentou melhor desempenho nas características adequadas para um sistema nanométrico, em termos de diâmetro médio e amplitude de distribuição granulométrica, foi a NE-OZ T4, obtida através do ultra-turrax com os dois tensoativos (P80 e MS). Com base nestes resultados preliminares encontrados, decidiu-se otimizar os parâmetros de síntese da NE-OZ, como tempo de ultra-turrax e temperatura de processamento, bem como a necessidade de pausa entre os ciclos.

Os resultados de $D(4,3)v$ e Span da segunda etapa de testes para otimização da nanoemulsão estão apresentados na Tabela 3 e na Figura 2. Aumentar o tempo de processamento da formulação, de 40 para 60 minutos, influenciou negativamente os valores de diâmetro médio e Span, conforme comparação entre os resultados de NE-OZ T4 (Tabela 2) e NE-OZ T5 (Tabela 3), o que pode ter ocorrido por aumento considerável da temperatura. Além disso, a utilização de banho de gelo (NE-OZ T6, Tabela 3) contribuiu para um aumento nos resultados de tamanho, indicando que parece

ser necessário atingir certa temperatura de aquecimento para poder haver quebra de gotícula, atingindo um tamanho nanométrico. Por fim, a utilização da pausa entre os ciclos (NE-OZ T7, Tabela 3) impactou de forma positiva para síntese de partículas de tamanho de 134 nm e Span de 1,212. Dessa forma, constatou-se que o intervalo de pausa com conseqüente diminuição da temperatura resulta em uma reorganização do sistema nanométrico.

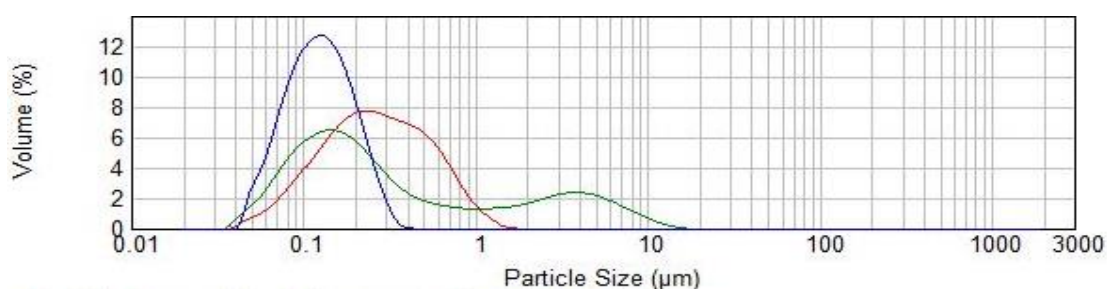


Figura 2. NE-OZ com variação de parâmetros de condição de processamento, NE-OZ T5 (linha vermelha); NE-OZ T6 (linha verde); NE-OZ T7 (linha azul).

Tabela 3. Análise de diâmetro das nanoemulsões desenvolvidas na segunda etapa de testes, pela técnica de difração de laser.

Formulações	D(4,3)v	Span
NE-OZ T5	331 nm	2,135
NE-OZ T6	1242 nm	18,412
NE-OZ T7	134 nm	1,212

Portanto, escolheu-se NE-OZ T7 como melhor sistema nanométrico, baseada nos valores obtidos de D(4,3)v e Span, utilizando P80 e MS como tensoativos, ultraturrax como equipamento de escolha, tempo de processamento de 60 com pausa de 1h, após 40 minutos de processamento, em temperatura ambiente.

3.2 Obtenção e caracterização físico-química dos sistemas nanoestruturados

Dois tipos de nanopartículas foram obtidas, uma nanoemulsão e uma suspensão de nanocápsulas, sendo a primeira através de uma técnica *top down*, e a segunda através de uma técnica *bottom up*. Em métodos *top down*, parte-se de sistemas complexos para atingir sistema mais simples, ou seja, formam-se estruturas pela redução de partículas de dimensões grandes até estas atingirem o tamanho nanométrico desejado. Já métodos *bottom up* caracterizam-se pela formação de um sistema complexo a partir de um sistema simples, onde são adicionados átomos e moléculas até formação de uma estrutura organizada (10). Métodos *top down* apresentam como vantagem a possibilidade de não usar solvente orgânico, porém não encontram grande aplicação em sistemas poliméricos (25). Métodos *bottom up* permitem a obtenção de sistemas nanométricos de forma reprodutível e com reduzido diâmetro médio (7).

Os sistemas nanoestruturados obtidos na presente investigação apresentaram aparência límpida e homogênea, com aspecto leitoso, coloração branca e baixa viscosidade (Figura 3). O odor de ambas é característico do óleo ozonizado.

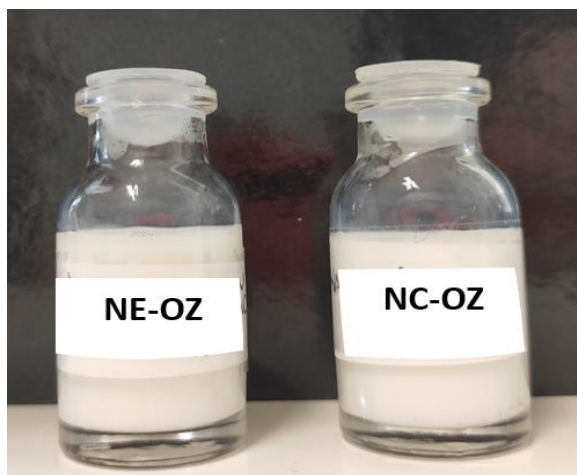


Figura 3. Aspecto macroscópico das formulações nanoestruturadas.

A técnica de difratometria a laser, ensaio de triagem, é utilizado para detectar sistemas nanoestruturados e possível presença de micropartículas. Os resultados provenientes dessa análise estão apresentando na Figura 4. Como pode-se observar, ambas as formulações se encontram dentro da faixa nanométrica, com valores de $D(4,3)v$ de 139 e 149 nm, sem diferença significativa, para NE-OZ e NC-OZ, respectivamente, com valores de Span adequados e com ausência de populações micrométricas.

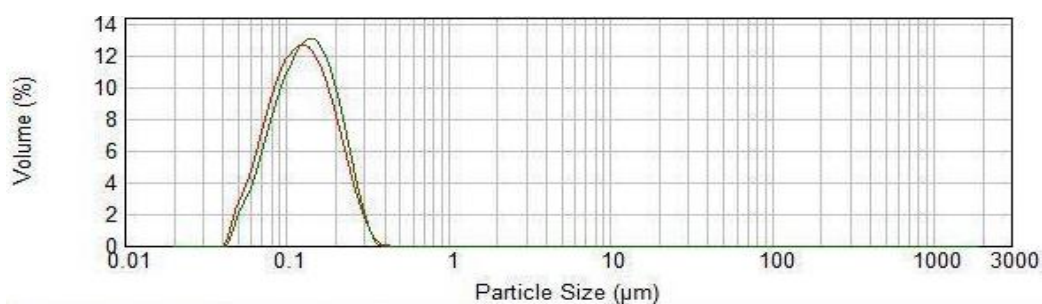


Figura 4. Distribuição de tamanho de gotícula e partícula pela técnica de difratometria a laser para as formulações NE-OZ (linha vermelha) e NC-OZ (linha verde), respectivamente, por difração a laser.

A determinação do tamanho das diferentes nanopartículas desenvolvidas contendo ozônio também foi realizado empregando a técnica de espalhamento de luz dinâmico (Figura 5). Os resultados de Z average apresentaram-se semelhantes aos observados por difração a laser, ainda que a NE-OZ apresente um tamanho significativamente menor quando comparada com a NC-OZ, conforme consta na Tabela 4. O valor representativo da polidispersão do sistema (PDI), para ambas as formulações indicou uma baixa amplitude de distribuição granulométrica.

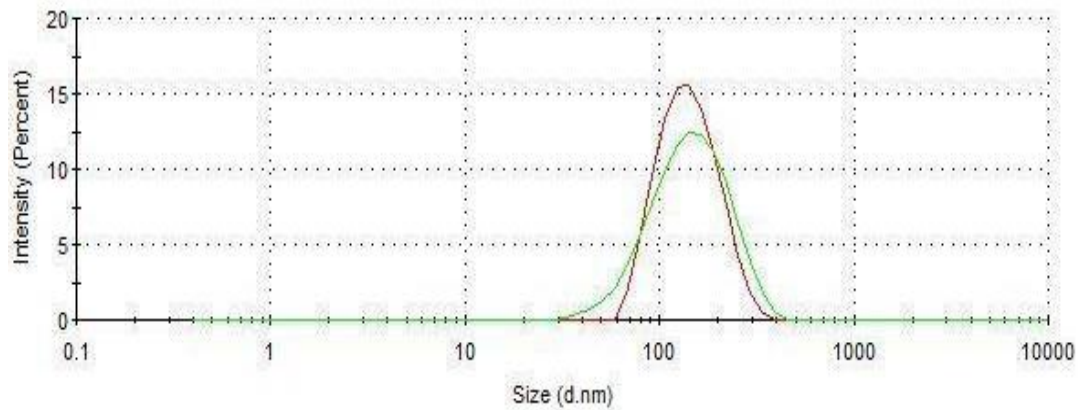


Figura 5. Distribuição de tamanho de gotícula e partícula e pela técnica de espalhamento de luz dinâmico para as formulações NE-OZ (linha verde) e NC-OZ (linha vermelha), respectivamente, por difração a laser.

Os dados encontrados de diâmetro das partículas estão de acordo com dados desejados para os respectivos sistemas manométricos. As nanocápsulas apresenta-se entre 50 e 300 nm (4) e nanoemulsões dentro de 50 e 1000 nm de diâmetro (26). Foi previamente descrito que nanocápsulas de Eudragit RS100 com diâmetro em cerca de 150 nm não são capazes de penetrar a pele intacta, devido ao seu grande tamanho (7), sendo seguras para utilização tópica. No mesmo sentido, as nanoemulsões, por facilmente perderem seu formato em contato com a temperatura corporal (2) não apresentam riscos ao serem aplicadas na pele.

Em relação aos valores obtidos de potencial zeta, o resultado positivo para a nanocápsulas (+11 mV) é esperado devido a presença do polímero Eudragit RS100 (7). Da mesma forma, o resultado negativo para nanoemulsão (-9 mV) está de acordo com o obtido por Godoy e colaboradores, que utilizou a mesma mistura de tensoativos na obtenção de uma nanoemulsão (20).

O valor de pH das NE-OZ e NC-OZ apresentou-se em torno de 3, sem diferenças significativas (Tabela 4). Embora o pH das formulações seja ácido, ambos se apresentam adequados para aplicação tópica, uma vez que se aproximam da faixa de

pH da pele em seu estado normal, de 4 e 6,5 (27). O valor ácido encontrado está de acordo com os dados de Aydin e colaboradores (2018) (16), que observaram que as nanoemulsões de óleo ozonizado apresentaram pH na faixa de 3,5 a 4,0. Já os resultados de densidade dos sistemas nanométricos apresentaram valores próximos a 1, sendo similar ao resultado encontrado pela água (21).

Tabela 4. Caracterização dos sistemas nanoestruturados.

Propriedade avaliada	NE-OZ	NC-OZ
D(4,3)v (nm)	139 ± 8	149 ± 6
Span	1,19 ± 0,21	1,15 ± 0,04
Z average (nm)	119 ± 8*	134 ± 1*
Índice de polidispersão (PDI)	0,15 ± 0,02	0,12 ± 0,03
Potencial zeta (mV)	-9,0 ± 1,7*	+11,4 ± 5,5*
pH	3,2 ± 0,1	3,3 ± 0,2
Densidade (g/mL)	1,0137 ± 0,0048	1,0247 ± 0,0218

*diferenças significativas considerando $p < 0,05$.

3.3 Análise da presença de ozônio nas formulações nanoestruturadas

Na Figura 6 consta o espectro FTIR do óleo de girassol, NE-OZ e NC-OZ. Como pode ser observado, o espectro do óleo de girassol ozonizado (linha verde) apresenta pico característico da presença de ozonídeo em 1104 cm^{-1} (16). Da mesma forma, ambos nanosistemas apresentaram sinal característico da presença de ozônio, com valores em 1092 e 1096 cm^{-1} , indicando que as técnicas para obtenção da nanoemulsão (*top down*) e nanocápsula (*bottom up*) foram eficazes para manter o ativo presente nas nanoestruturas.

A técnica *bottom up* utiliza a presença de solvente orgânico, que deve ser evaporado por meio de rotaevaporador. A eliminação do solvente não retirou o ozônio da suspensão de nanocápsulas.

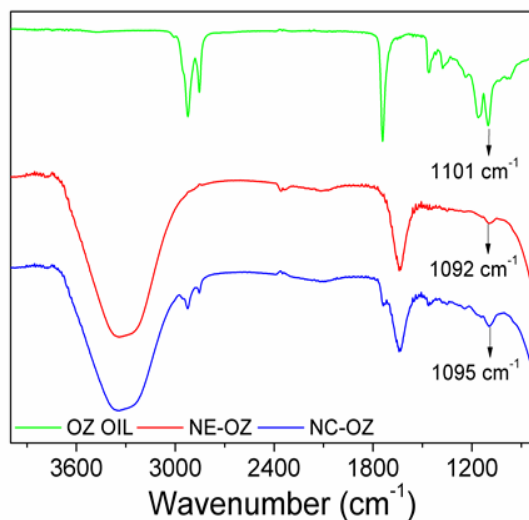


Figura 6. Espectro por FTIR do óleo de girassol ozonizado, NE-OZ e NC-OZ na região de 4000 a 800 cm^{-1} .

3.4 Análise da estabilidade das formulações nanoestruturadas

A estabilidade das formulações avaliadas em termos de pré-estabilidade, através de centrifugação da formulação não revelou a presença de separação de fases das amostras (22). Este resultado indica que os sistemas apresentam potencial para serem estáveis a longo prazo.

Em relação aos ensaios de estabilidade preliminar (Tabela 5), as formulações mantiveram seus aspectos macrométricos como homogeneidade, limpidez e coloração branca, com viscosidade baixa e odor típico do óleo ozonizado. Os resultados de Z average e densidade mantiveram os seus valores indicando uma estabilidade para as amostras (dados não mostrados). Os valores de potencial zeta apresentaram declínio

indicando possível tendência à instabilidade, porém os valores de diâmetros foram mantidos.

Observou-se que os valores de pH baixaram para todas as formulações, indicando uma possível degradação da amostra. Os valores de pH são influenciados pela presença do valor de acidez dos óleos ozonizados, que aumentam durante o armazenamento (17). O pH muito baixo, como o observado após o estudo de estabilidade não é compatível com a faixa adequada para a pele (4,5 - 6,5) (27) podendo ser irritante para uso tópico. Entretanto, considera-se possível ajustar o pH com substâncias de caráter básico, ao incorporar os sistemas nanométricas em veículos como géis e pomadas.

Tabela 5. Resultados de testes de estabilidade preliminar, considerando parâmetros para os quais foram observadas alterações.

Formulação	Condição	pH	Potencial Zeta (mV)
NE-OZ	40°C	2,34	-5,24
NE-OZ	4°C	2,72	-5,48
NC-OZ	40°C	2,24	+9,91
NC-OZ	4°C	2,57	+8,81

3.5 Análise da potencial atividade frente a dermatófitos

Os resultados do ensaio da concentração inibitória mínima em isolados fúngicos utilizando NE-OZ e NC-OZ e que se encontram descritos na Tabela 6, mostram que ambas as formulações tiveram atividade antifúngica para os dois isolados testados, indicando uma possibilidade de tratamento de micoses oriundas destes dermatófitos. Os valores de CIM encontrados na presente investigação estão de acordo com o trabalho de Geweely e colaboradores (2006) (16) que avaliou a atividade do óleo ozonizado não nanoencapsulado em dermatófitos (*Trichophyton*, *Epidermophyton floccosum* e *Microsporium canis*). Estes são fungos filamentosos causadores de micoses cutâneas comuns que utilizam a queratina da pele, cabelo e unhas como nutrientes (28).

Tabela 6. Concentração inibitória mínima para NC-OZ e NE-OZ.

Isolados	Concentração inibitória mínima (mg/mL)	
	NC-OZ	NE-OZ
TRU47	0,78125	1,5625
MCA01	0,78125	1,5625

(TRU: *Trichophyton rubrum*; MCA: *Microsporium canis*)

Pode-se observar que a NC-OZ se mostrou mais ativa frente aos dermatófitos testados, com um menor valor de concentração inibitória quando comparada com a NE-OZ. Flores e colaboradores (2013) (12) também obtiveram uma maior atividade inibitória de crescimento de *Trichophyton rubrum* utilizando óleo de melaleuca nanoencapsulado do que o mesmo ativo na nanoemulsão em micoses de unha. O efeito mais pronunciado da nanocápsula foi atribuído pelos autores a sua organização estrutural, pois ela possui uma parede polimérica que protege o ativo, promovendo uma

liberação gradual e prolongada do mesmo. Também, deve-se considerar o potencial zeta positivo das nanocápsulas, que pode promover uma maior interação como dermatófitos, facilitando a ação do óleo ozonizado.

4. CONCLUSÃO

No presente trabalho, NC-OZ e NE-OZ foram desenvolvidos baseados em métodos conhecidos como *bottom up* e *top down*. A obtenção da NC-OZ deu-se por método previamente descrito na literatura e apresentou parâmetros aceitáveis quanto ao tamanho de partícula e homogeneidade do sistema, bem como comportamento adequado durante todo o estudo. A NE-OZ foi obtida variando parâmetros como equipamento, tempo e condições de processamento, bem como tipo de tensoativo. Obteve-se uma formulação estável, e com características nanométricas. Ambas as formulações apresentaram no espectro de FTIR o pico característico do ozonídeo, além do odor que evidenciava a presença do ativo. NC-OZ e NE-OZ apresentaram-se efetivas com concentrações inibitórias mínimas de 0,78125 mg/mL e 1,5625 mg/mL, respectivamente, frente aos dermatófitos *Trichophyton rubrum* e *Microsporum canis*. Conclui-se, portanto que o estudo aponta uma potencial terapia alternativa ao uso de antifúngicos tradicionais, entretanto pesquisas futuras ainda são necessárias.

AGRADECIMENTOS

Agradecimentos à professora Sílvia Stanisquaski Guterres do laboratório 405 da Faculdade de Farmácia da UFRGS, pela disponibilização de uso dos equipamentos e ao fomento recebido pela FAURGS (Edital Recém Contratados UFRGS 2019).

REFERÊNCIAS

- (1) Schmaltz C, Dos Santos JV, Guterres SS. Nanocápsulas como uma tendência promissora na área cosmética: a imensa potencialidade desse pequeno recurso. *Infarma*.2005;16(13-14):80-85.
- (2) Venturini CG, Bruinsmann FA, Contri RV, Fonseca FN, Frank LA, D'Amore CM, Raffin RP, Buffon A, Pohlmann AR, Guterres SS. Co-encapsulation of imiquimod and copaiba oil in novel nanostructured systems: promising formulations against skin carcinoma. *Pharm Sci*. 2015; 79:36-43. doi: 10.1016/j.ejps.2015.08.016.
- (3) Ourique AF, Melero A, Da Silva CDB, Schaefer UF, Pohlmann AR, Guterres SS, Lehr CM, Kostka KH, Beck RCR. Improved photostability and reduced skin permeation of tretinoin: Development of a semisolid nanomedicine. *Euro Journ of Pharma and Biopharma*.2011;79 : 95-101. doi:10.1016/j.ejpb.2011.03.008
- (4) Daudt RM, Emanuelli J, Külkamp-Guerreiro IC, Pohlmann AR, Guterres SS. A nanotecnologia como estratégia para o desenvolvimento de cosméticos. *Cienc. Cult*. 2013;65(3). DOI: 10.21800/S0009-67252013000300011.
- (5) Külkamp-Guerreiro IC, Berlitz SJ, Contri RV, Alves LR, Henrique EG, Barreiros VRM, Guterres SS. Influence of nanoencapsulation on the sensory properties of cosmetic formulations containing lipoic acid. *Inter Jour of Cosm Sci*.2013;35, 105–111. DOI: 10.1111/ics.12013.
- (6) Schaffazick SR, Pohlmann AR, Freitas LL, Guterres SS. Caracterização e Estudo de Estabilidade de Suspensões de Nanocápsulas e de Nanoesferas Poliméricas Contendo Diclofenaco. *Acta Farm. Bonaerense*.2002; 21 (2): 99-106.
- (7) Contri RV, Kulkamp-Guerreiro IC, Da Silva SJ, Frank LA, Pohlmann AR, Guterres SS. Nanoencapsulation of Rose-Hip Oil Prevents Oil Oxidation and Allows Obtainment of Gel and Film Topical Formulations. *AAPS PharmSciTech*.2015; 17,(4), 863-871. DOI:10.1208/s12249-015-0379-9.
- (8) Nastiti CMRR, Ponto T, Abd E, Grice JE, Benson HAE, Roberts MS. Topical Nano and Microemulsions for Skin Delivery. *Pharma*.2017;9(37) 3-25. DOI:10.3390/pharmaceutics9040037
- (9) Rai VK, Mishra N, Yadav KS, Yadav PN. Nanoemulsion as pharmaceutical carrier for dermal and transdermal drug delivery: Formulation development, stability

issues, basic considerations and applications. *Jour of Contro Rele*. 2017;270, 203-225. DOI: 10.1016/j.jconrel.2017.11.049.

(10) Gonçalves JC. *Nanotecnologia Aplicada à Pele*. [Tese]. Lisboa: Escola de Ciências e Tecnologias da Saúde, Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias.2014.

(11) Santos, et al. Innovative nanocompounds for cutaneous administration of classical antifungal drugs: a systematic review. *J Dermatolog Treat*. 2019; 30(6):617-626. DOI: 10.1080/09546634.2018.1479726.

(12) Flores FC, de Lima JA, Ribeiro RF, Alves SH, Rolim CM, Beck RC, da Silva CB. Antifungal activity of nanocapsule suspensions containing tea tree oil on the growth of *Trichophyton rubrum*. *Mycopathologia*. 2013;175(3-4):281-6. DOI: 10.1007/s11046-013-9622-7.

(13) Motedayen N, Hashemi SJ, Rezaei S, Bayat M. In-Vitro Evaluation of Antifungal Activity of Terbinafine and Terbinafine Nano-Drug Against

(14) Clinical Isolates of Dermatophytes. *Jundishapur J Microbiol*. 2018 ; 11(5).DOI: 10.5812/jjm.62351.

(15) Ouf SA, Moussaa TA, Abd-Elmegeedb AM, Eltahlawy SR. Anti-fungal potential of ozone against some dermatophytes. *Bra jour of micro*.2016; 4(7)697–702. DOI: 10.1016/j.bjm.2016.04.014

(16) Geweely NSI. Antifungal activity of ozonized olive oil. *Internet Journ of Agri e Bio*.2006; 8 (5)670-675.

(17) Aydın RST, Kazanc F. Synthesis and Characterization of Ozonated Oil Nanoemulsions. *J Am Oil Chem Soc*. 2018. DOI 10.1002/aocs.12150.

(18) Oğuzkan SB, Kaya ST, Cesur A, Karagül B, Uğraş S, Uğraş HI. Determination of Effect on Cutaneous Wound Healing of Ozonated Hazelnut Oil. *Proceedings*.2018; 2, 1537; DOI:10.3390.

(19) Travagli V, Zanardi I, Valacchi G, Bocci V. Ozone and Ozonated Oils in Skin Diseases: A Review. *Hind Publi Corp Medi of Inflamm*. 2010; 9 pages. DOI:10.1155/2010/610418

(20) Godoi SN, Quatrin PM, Sagrillo MR, Nascimento K, Wagner R, Klein B, Santos RCV, Ourique AF. Evaluation of Stability and In Vitro Security of

Nanoemulsions Containing Eucalyptus globulus Oil. *Hindawi BioMed Res Inter.* 2017. DOI: 10.1155/2017/2723418.

(21) BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária, Guia de Controle de Qualidade de Produtos Cosméticos Uma Abordagem sobre os Ensaio Físicos e Químicos, Editora ANVISA. Brasília, 2007.

(22) BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária, Guia de Estabilidade de Produtos Cosméticos, Editora ANVISA. Brasília, 2004.

(23) Kumar R, Kaur K, Pandey SK, Kumar R, Uppal S, Mehta SK. Fabrication of benzylisothiocyanate encapsulated nanoemulsion through ultrasonication: Augmentation of anticancer and antimicrobial attributes. *Journ of Mol Liq.* 2018;(263)324-333. DOI:10.1016 /j.molliq.2018.04.110

(24) Paudel SK, Bhargava K, Kotturib H. Antimicrobial activity of cinnamon oil nanoemulsion against *Listeria monocytogenes* and *Salmonella* spp. on melons. *LTW- Food Sci and Tec.* 2019; (111) 682-687. DOI:10.1016.

(25) Páez-Hernández G, Mondragón-Cortez P, Espinosa-Andrew H. Developing curcumin nanoemulsions by high-intensity methods: Impact of ultrasonication and microfluidization parameters *LTW- Food Sci and Tec.* 2019; (111)291-300. DOI:10.1016/j.lwt.2019.05.012

(26) Assis LM, Zavareze ER, Prentice-Hernández C, Souza-Soares LA. Characteristics of nanoparticles and their potential applications in foods. *Bra Jour of Food Tec.* 2012; 15, (2) 99-109. DOI: 10.1590/S1981-67232012005000004.

(27) Kashiwabara TB, Kashiwabara YMB, Rocha LLV, Bacelar LFF, França PLVL, Kashiwabara LMR, Kashiwabara YB. *Medicina Ambulatorial IV.* 4 ed. Montes Claros, MG: Dejan gráfica e editora. 2006.

(28) Peres NTA, Maranhão FCA, Rossi A, Martinez-Rossi NM. Dermatophytes: host-pathogen interaction and antifungal resistance. *An Bras Dermatol.* 2010;85(5)657-67. DOI: 10.1590/S0365-05962010000500009.

ANEXO

**NORMAS PARA PUBLICAÇÃO NA REVISTA INFARMA-CIÊNCIAS
FARMACÊUTICAS**

Anexo – Normas da Revista INFARMA- CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

Infarma - Ciências Farmacêuticas publica artigos originais, revisões da literatura e notas técnicas relacionados às áreas de Ciências Farmacêuticas, nos idiomas inglês, português e espanhol.

Os manuscritos deverão ser submetidos no formato eletrônico da revista.

Cada manuscrito (em arquivo único) deve ser acompanhado de **carta de submissão**, cujo texto deverá ser inserido no espaço "**Comentários para o Editor**", ou como documento suplementar.

Nos comentários para o editor os **autores devem sugerir** o nome de **3 avaliadores**, acompanhado do email para contato de cada um. Contudo, Infarma – Ciências Farmacêuticas reserva o direito de utilizar os avaliadores sugeridos, ou não. **IMPORTANTE:** Os avaliadores sugeridos devem ser doutores e com publicações nos últimos três anos

Os metadados devem ser completamente preenchidos, **inclusive com o endereço completo da instituição de cada autor**. É fortemente recomendado que os autores insiram seu número ORCID. O cadastro pode ser feito em <https://support.orcid.org/hc/en-us>

Preparação de artigo original: Os manuscritos devem ser digitados no editor de texto MS Word (ou Editor equivalente), em uma coluna, usando fonte Times New Roman 12, no formato A4 (210x297mm), mantendo margens laterais de 3 cm e espaço duplo em todo o texto. Todas as páginas devem ser numeradas.

O manuscrito deve ser organizado de acordo com a seguinte ordem: Título, resumo, palavras-chave, introdução, material e métodos, resultados, discussão, agradecimentos, referências, figuras, legendas de figuras e tabelas.

a) **Os autores do documento devem se assegurar que excluam do texto os nomes dos autores e sua afiliação.**

b) Em documentos do Microsoft Office, a identificação do autor deve ser removida das propriedades do documento (no menu Arquivo > Propriedades), iniciando em Arquivo, no menu principal, e clicando na sequência: Arquivo > Salvar como... > Ferramentas (ou Opções no Mac) > Opções de segurança... > Remover informações pessoais do arquivo ao salvar > OK > Salvar

Título do artigo: deve ser conciso, informativo e completo, evitando palavras supérfluas. Os autores devem apresentar versão para o inglês, quando o idioma do texto for português ou espanhol.

Resumo e Abstract: Os artigos deverão vir acompanhados do resumo em português e do abstract em inglês. Devem apresentar os objetivos do estudo, abordagens metodológicas, resultados e as conclusões e conter no máximo **250 palavras**.

Palavras-chave e Keywords: Deve ser apresentada uma lista de 3 a 6 termos, separados por ponto-e-vírgula, indexados em português e inglês, utilizando Tesouro Medline, ou descritores da área da Saúde DeCS Bireme <<http://decs.bvs.br>>.

Introdução: Deve determinar o propósito do estudo e oferecer uma breve revisão da literatura, justificando a realização do estudo e destacando os avanços alcançados através da pesquisa.

Material e Métodos: Todos os materiais e métodos utilizados devem ser descritos. Para a metodologia mais conhecida ou farmacopeica, a descrição deve ser concisa e incluir a referência adequada.

Material biológico: Deve conter, quando apropriado, as informações taxonômicas: família, sinonímia científica e autor. Uma breve descrição da espécie, se necessária, o material estudado, procedência, dados ecológicos e nome da pessoa que fez a identificação. Para material vegetal, devem ser fornecidos dados do exemplar (exsicata) e do herbário ou coleção onde está depositado. Caso seja cultivado, os dados agronômicos devem ser fornecidos.

Quando o material biológico (inclusive mel e própolis) for adquirido no mercado, deve ser providenciada a comprovação de identidade adequada e quando procedente, o perfil químico. Devem ser fornecidos os dados do produto (procedência, lote, etc) e, quando possível, o certificado de análise.

Para extratos brutos deve ser apresentado um perfil cromatográfico ou ser padronizado por um marcador ou um perfil farmacognóstico.

Ensaio com células: Devem ser providenciados os dados de linhagens celulares utilizadas, as condições de cultivo e incubação, bem como as características dos meios de cultura utilizados.

Animais: Devem ser informados: raça, idade, peso, origem, aprovação pelo comitê de ética, etc.

Reagentes: Os reagentes devem ser identificados. O nome genérico deve estar em minúsculas (por exemplo, anfotericina, digoxina). Os fármacos novos ou não comumente utilizados devem ser identificados por seu nome químico (IUPAC). As doses utilizadas devem ser citadas em unidades de massa por quilograma (ex. mg/kg) e as concentrações em molaridade. Para misturas complexas (por exemplo, extratos brutos), devem ser utilizados mg/mL, µg/mL, ng/mL, etc.

As vias de administração devem ser citadas por extenso pela primeira vez, com a abreviação em parênteses. Para citações subsequentes devem ser utilizadas as abreviações: intra-arterial (i.a.), intracerebroventricular (i.c.v.), intragástrica (i.g.),

intramuscular (i.m.), intraperitoneal (i.p.), intravenosa (i.v.), *per os* (p.o.), subcutânea (s.c.) ou transdérmica (t.d.).

Caracterização de um composto:

Devem ser seguidos os exemplos abaixo:

MP: 101-103 °C.

$[\alpha]_D^{25} +35,4$ (c 1.00, CHCl₃).

R_f : 0,4 (CHCl₃-MeOH, 5:1).

IR (KBr): 3254, 3110, 1710, 1680, 1535, 1460, 970 cm⁻¹.

UV/Vis λ_{max} (MeOH) nm (log ϵ): 234 (3,80), 280 (4,52), 324 (3,45).

¹H RMN (400 MHz, CDCl₃): 1,90 (3H, s, Me), 2,79 (3H, s, COMe), 7,20 (1H, d, *J* = 8,1 Hz, H-7)

¹³C RMN (100 MHz DMSO-d₆): 8,9 (CH₃), 30,3 (CH₂), 51,9 (CH), 169,6 (C).

MS (EI, 70 eV): m/z (%) = 290,2 [M + H⁺] (100), 265,9 (90).

HRMS-FAB: m/z [M + H⁺] calc para C₂₁H₃₈N₄O₈S: 475,529; encontrado: 475,256.

Anal. Calc para C₃₂H₅₀BrP: C, 70,44; H, 9,24. Encontrado C, 70,32; H = 9,43.

RMN de ¹H: para sinais bem resolvidos, fornecer as constantes de acoplamento. Depois de cada deslocamento químico (d), indicar, entre parênteses o número de hidrogênios, a multiplicidade, as constantes de acoplamento.

RMN de ¹³C: Os dados devem apresentar precisão de 0,01 ppm.

Dados cristalográficos: Se uma representação de estrutura cristalina for incluída (por exemplo, ORTEP), deve ser acompanhada pelos seguintes dados: fórmula, dados do cristal, método de coleta dos dados, métodos de refinamento da estrutura, tamanho e ângulos das ligações.

Estatística: O detalhamento do tratamento estatístico é importante, bem como o programa utilizado. As variações dos dados devem ser expressas em termos de erro padrão e média de desvio padrão. O número de experimentos e réplicas devem ser informados. Se for utilizado mais de um tratamento estatístico isso deve ser claramente especificado.

Resultados: Devem ser apresentados seguindo uma sequência lógica, sendo mencionados somente os dados mais relevantes e a estatística. As tabelas e figuras devem ser identificadas com números arábicos. As figuras devem ser preparadas levando em conta uma largura máxima de 8,2 cm, nos formatos JPEG, JPG, TIFF ou BMP. As tabelas devem ser preparadas como texto, não como imagem, com linhas horizontais e espaçamento 1,5 cm. Uma legenda auto-explicativa deve ser incluída tanto para tabelas quanto para figuras.

Para desenhar estruturas químicas, recomendamos os softwares abaixo. Contudo outros programas, de livre escolha dos autores, podem ser utilizados:

MarvinSketch (para Windows e outros sistemas): <http://www.chemaxon.com/product/msketch.html>

Biovia: <http://accelrys.com/products/collaborative-science/biovia-draw/>

EasyChem for MacOS: http://sourceforge.net/project/showfiles.php?group_id=90102

Os Resultados e Discussão podem ser reunidos (RESULTADOS E DISCUSSÃO)

Figuras, Tabelas e Quadros que não sejam de autoria própria só poderão ser utilizados com o consentimento formal dos detentores dos direitos para publicação.

Discussão: Deve explorar o máximo possível os resultados obtidos, relacionando-os com os dados já registrados na literatura. Somente as citações indispensáveis devem ser incluídas.

Conclusão: Deve conter preferencialmente no máximo 150 palavras mostrando como os resultados encontrados contribuem para o conhecimento.

Agradecimentos: Devem ser mencionadas as fontes de financiamento e/ou indivíduos que contribuíram substancialmente para o estudo.

Referências bibliográficas: Devem ser citadas apenas aquelas essenciais ao conteúdo do artigo. Devem ser alocadas em ordem de citação, de acordo com o estilo Vancouver (numérico, entre parênteses), que pode ser conferido em <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/nbk7256/>

Nas publicações com até **dez autores**, citam-se **todos**; acima desse número, cita-se o primeiro seguido da expressão et alii (abreviada et al.). O D.O.I., quando disponível, deve ser inserido.

Os títulos de revistas devem ser abreviados de acordo com o estilo usado no Index Medicus. Consultar a lista de periódicos indexados no Index Medicus publicada no seguinte endereço eletrônico: <http://www.nlm.nih.gov/tsd/serials/lsiou.html>.

• Artigos de periódicos: Docherty JR. Subtypes of functional a1 and a2 adrenoceptors. Eur J Pharmacol . 1998;361(1):1-15. DOI:10.3409/fb61_1-2.79

Martins MBG, Martins AR, Cavalheiro AJ, Telascrêa M. Caracterização biométrica e química da folha de *Mentha pulegium* x *spicata* (Lamiaceae). Rev Ciênc Farm. 2004;25(1):17-23.

Araujo N, Kohn A, Katz N. Activity of the artemether in experimental *Schistosomiasis mansoni*. Mem Inst Oswaldo Cruz 1991;86(Suppl 2):185-188.

Yue WJ, You JQ, Mei JY. Effects of artemether on *Schistosoma japonicum* adult worms andova. Acta Pharmacol Sin. 1984;5(2 Pt 1):60-63.

- Artigo sem volume e número: Combes A. Etude d'excipients utilisés dans l' industrie pharmaceutique. STP Pharma 1989:766-790.

- Artigo sem autor: Coffee drinking and cancer of the pancreas [editorial]. Br Med J Clin Res. 1981;283(6292):628.

Bhutta ZA, Darmstadt GL, Hasan BS, Haws RA. Community-based interventions for improving perinatal and neonatal health outcomes in developing countries: a review of the evidence. Pediatrics. 2005;115(2 Suppl):519-617. DOI:10.1542/peds.2004-1441.

- Instituição como autor: DPPRG. Diabetes Prevention Program Research Group. Hypertension, insulin, and proinsulin in participants with impaired glucose tolerance. Hypertension 2002;40(5):679-686.

- Instituição como autor e editor: BRASIL. Ministério da Saúde. Manual de controle das doenças sexualmente transmissíveis. 3ª ed. Brasília (DF); 1999.

NICARAGUA. Ministerio de Salud de Nicaragua. Política nacional de salud 1997-2002: descentralización y autonomia. Managua: Ministerio de Salud; 2002.p.42-9.

- Trabalho apresentado em congresso (deverão ser incluídos somente se o artigo não estiver disponível): Alencar LCE, Seidl EMF. Levantamento bibliográfico de estudos sobre doadoras de leite humano produzidos no Brasil. In: 2. Congresso Internacional de Bancos de Leite Humano. 2005. Brasília: Ministério da Saúde; 2005.

Harley NH. Comparing radon daughter dosimetric and risk models. In: Gammage RB, Kay SV, editors. Indoor air and human Health. Proceedings of the Seventh Life Sciences Symposium. 1984 Oct 29-31; Knoxville, TN. Chelsea, MI: Lewis, 1985:69-78.

- Livros: Goodman LS. The pharmacological basis of therapeutics. 2nd. ed. New York: Macmillan. 1955.

Brunton LL, Lazo JS, Parker KL, editors. Goodman & Gilman's the pharmacological basis of therapeutics. 11th. ed. Chicago: McGraw-Hill. 2006.

- Capítulos de livros: Laurenti R. A medida das doenças. In: Forattini OP. Ecologia, epidemiologia e sociedade. São Paulo: Artes Médicas. 1992. p.369-98.

Fisberg RM, Marchioni D, Slater B. Avaliação da dieta em grupos populacionais [online]. In: Usos e aplicações das Dietary Reference Intakes – DRIs ILSI/SBAN; 2001. Disponível em: <http://www.sban.com.br/educ/pesq/LIVRO-DRI-ILSI.pdf>.

- Editores, Compiladores: Dienner HC, Wilkinson M, editors. Drug induced headache. New York: Springer-Verlag. 1988.

- Livro em CD-ROM: Martindale: the complete drug reference [CD-ROM]. Englewood, CO: Micromedex. 1999. Based on: Parfitt K, editor.

Martindale: the complete drug reference. London: Pharmaceutical Press; 1999. International Healthcare Series.

- Dissertação e Tese (somente deverão ser incluídas se o artigo não estiver disponível):

Moraes EP. Envelhecimento no meio rural: condições de vida, saúde e apoio dos idosos mais velhos de Encruzilhada do Sul, RS. [Tese]. Ribeirão Preto: Escola de Enfermagem, Universidade de São Paulo. 2007.

Chorilli M. Desenvolvimento e caracterização de lipossomas contendo cafeína veiculados em géis hidrofílicos: estudos de estabilidade e liberação in vitro [Dissertação]. Araraquara: Faculdade de Ciências Farmacêuticas, UNESP. 2004.

- Documentos legais, Leis publicadas:

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 27, de 30 de março de 2007. Dispõe sobre o Sistema Nacional de Gerenciamento de Produtos Controlados - SNGPC estabelece a implantação do módulo para drogarias e farmácias e dá outras providências. Diário Oficial da União, nº 63, 2 de abril de 2007. Seção 1. p. 62-4.

SP. São Paulo (Estado). Decreto no 42.822, de 20 de janeiro de 1998. Lex: coletânea de legislação e jurisprudência, São Paulo, 1998; 62(3): 217-220.

PMSP. Prefeitura Municipal de São Paulo. Lei Municipal no. 12.623, de 6 de maio de 1998. Proíbe a comercialização de água mineral com teor de flúor acima de 0,8 mg/l no município e dá outras providências. Diário Oficial do Município. 13 maio 1998.

Projetos de lei:

Medical Records Confidentiality Act of 1995, S. 1360, 104th Cong., 1st Sect. (1995). Código de regulamentações federais Informed Consent, 42 C.F.R. Sect. 441.257 (1995).

Patente:

Harred JF, Knight AR, McIntyre JS, inventors. Dow Chemical Company, assignee. Exoxidation process. US patent 3,654,317. 1972 Apr 4.

- Software:

Hintze JL. NCSS: statistical system for Windows. Version 2001. Kaysville, UT: Number Cruncher Statistical Systems; 2002. Epi Info [computer program]. Version 6. Atlanta, GA: Centers for Disease Control and Prevention; 1994.

EPI Info: a data base and statistics program for public health professionals Version 3.2.2. Atlanta, GA: Centers for Disease Control and Prevention (CDC); 2005. [cited 2006 May 30]. Available from: <http://www.cdc.gov/epiinfo/biblio.htm> • website Health on the net foundation.

Health on the net foundation code of conduct (HONcode) for medical and health web sites. [cited 1998 June 30]. Available from: <http://www.hon.ch/Conduct.html>. Hoffman DL. St John's Wort. 1995; [4 screens]. [cited 1998 July 16]. Available from: <http://www.healthy.net/library/books/hoffman/materiamedica/stjohns.htm>.

Preparação de Artigo de Revisão e notas técnicas: Essas contribuições seguem estilo livre segundo os critérios dos autores, *exceto quanto à formatação das referências e citações*.

O artigo de revisão deve conter uma revisão crítica de assunto atual e relevante com base em artigos publicados e em resultados do autor. Deve apresentar resumo na língua em que estiver redigido e um Abstract quando redigido em português ou espanhol.

A nota técnica deve conter a aplicação de uma técnica a uma análise específica ou conter análise objetiva sobre uma política pública ou programa de governo, propondo alternativas para a superação de eventuais gargalos, problemas técnicos, etc.

INFORMAÇÕES ADICIONAIS.

Citações bibliográficas no texto: Devem ser numeradas na ordem de citação utilizando o formato (número). Ex. Os dados da literatura (1,2)

Ilustrações Figuras: Fotografias, gráficos, mapas ou ilustrações devem ser apresentadas embebidas no texto ou em folhas separadas, no final do manuscrito, numeradas consecutivamente em algarismos arábicos seguindo a ordem em que aparecem no texto (Os locais aproximados das figuras deverão ser indicados no texto). As legendas correspondentes deverão ser claras, concisas e auto-explicativas. Para figuras e fotografias deverão ser encaminhadas cópias digitalizadas em formato jpg ou tif, com resolução mínima de 300 dpi. Deverão estar em arquivos separados e não inseridas no texto.

Tabelas: Podem ser colocadas no final do manuscrito ou embebidas no texto. Devem complementar e não duplicar as informações do texto. Devem ser auto-explicativas. Elas devem ser numeradas em algarismos arábicos. Um título breve e autoexplicativo deve constar no alto de cada tabela.

Ética: Os pesquisadores que utilizarem em seus trabalhos experimentos com seres humanos, material biológico humano ou animais, devem observar as normas vigentes editadas pelos órgãos oficiais. **Os trabalhos que envolvem experimentos que necessitam de avaliação do Comitê de Ética deverão ser acompanhados de cópia do parecer favorável, enviados como documento suplementar.**

Infarma - Ciências Farmacêuticas segue as recomendações do *Committee on Publication Ethics* (COPE). As Diretrizes do COPE estimulam e incentivam a conduta ética de editores e autores, incentivando a identificação ativa de plágio, mal prática editorial e na pesquisa, fraudes, possíveis violações de ética, dentre outros. Infarma - Ciências Farmacêuticas recomenda que Autores, Revisores e Editores acessem o site <http://publicationethics.org>, onde podem ser encontradas informações úteis sobre ética em pesquisa e em publicações.

Os manuscritos que não estiverem redigidos de acordo com as Instruções aos autores não serão analisados.

Sugere-se, enfaticamente, que autores submetam os manuscritos, previamente à submissão, a programas de detecção de plágio

Crítérios de autoria: A autoria confere crédito e tem importantes implicações acadêmicas, sociais e financeiras. A autoria também implica responsabilidade pelo trabalho publicado. As seguintes recomendações destinam-se a garantir que os contribuintes que fizeram contribuições intelectuais substanciais para um documento recebem crédito como autores, mas também os contribuintes creditados à medida que os autores entendem seu papel em assumir a responsabilidade e ser justificável no manuscrito a ser publicado.

O autor correspondente é aquele que assume a responsabilidade principal pela comunicação com a revista durante a submissão, processo de revisão pelos pares e processo de publicação. É o autor que garante que todos os requisitos administrativos do jornal, como o fornecimento de detalhes de autoria, registro de documentação e aprovação do comitê de ética, e recolhimento de formulários e declarações de conflito de interesse, sejam devidamente preenchidos.

Infarma - Ciências Farmacêuticas recomenda que a autoria seja baseada nos seguintes critérios:

1. Contribuições substanciais para a concepção ou planejamento do trabalho; ou a aquisição, análise ou interpretação de dados para o trabalho.
2. Redação do trabalho ou revisão crítica do conteúdo intelectual importante.
3. Aprovação da versão final a ser submetida à publicação.
4. O termo de concordância é responsável por todos os aspectos do trabalho para garantir que as questões relacionadas à precisão ou integridade qualquer parte do trabalho sejam devidamente investigadas e resolvidas.

Infarma - Ciências Farmacêuticas recomenda que a designação dos autores seja baseada nos seguintes critérios:

1. Todos os autores devem atender a todos os critérios de autoria e, todos aqueles que atenderem aos critérios devem ser identificados como autores.
2. Aqueles que não cumprem os quatro critérios devem ser reconhecidos em agradecimentos.
3. Esses critérios de autoria destinam-se a reservar o status de autoria para aqueles que merecem o crédito e podem assumir a responsabilidade pelo trabalho.
4. Os indivíduos que conduzem o trabalho são responsáveis por identificar quem cumpre esses critérios e, idealmente, deve fazê-lo ao planejar o trabalho, fazendo modificações apropriadas na medida em que o trabalho se desenvolve.

O manuscrito será avaliado por ao menos 3 revisores independentes, que emitirão sua opinião. Contudo os editores reservam o direito de tomar a decisão final e proceder qualquer modificação necessária para ajustar o manuscrito ao estilo de Infarma - Ciências Farmacêuticas.

Condições para submissão

Como parte do processo de submissão, os autores são obrigados a verificar a conformidade da submissão em relação a todos os itens listados a seguir. **As submissões que não estiverem de acordo com as normas serão devolvidas aos autores.**

1. Os autores leram e seguiram estritamente as orientações para autores de Infarma - Ciências Farmacêuticas
2. A contribuição é original e inédita, não foi publicada ou não está sendo avaliada para publicação por outra revista
3. O arquivo da submissão está em formato .doc, .docx ou .RTF.
4. URL ou D.O.I. para as referências foram informados quando possível.
5. O texto está em espaço duplo; usa uma fonte de 12-pontos; emprega itálico em vez de sublinhado
6. O texto segue os padrões de estilo e requisitos bibliográficos descritos em Orientações para Submissão, na página Sobre a Revista.
7. Em caso de submissão a uma seção com avaliação pelos pares (ex.: artigos), as instruções disponíveis em Assegurando a avaliação pelos pares cega foram seguidas.
8. Na carta ao Editor foram incluídos 3 nomes com os respectivos email de contato, como sugestão de avaliadores com expertise para analisar o manuscrito. Os avaliadores sugeridos devem ser pesquisadores com produção científica qualificada e que tenham publicado em periódicos avaliados por pares nos últimos três anos.
9. Se pertinente, em material e método foi informado o número do protocolo de aprovação por comitê de ética
10. Os metadados estão completamente preenchidos, com o endereço completo da instituição de cada autor

Condições para submissão

Como parte do processo de submissão, os autores são obrigados a verificar a conformidade da submissão em relação a todos os itens listados a seguir. As submissões que não estiverem de acordo com as normas serão devolvidas aos autores.

1. Os autores leram e seguiram estritamente as Diretrizes para autores de Infarma -Ciências Farmacêuticas
2. A contribuição é original e inédita, não foi publicada ou não está sendo avaliada para publicação por outra revista
3. O arquivo da submissão está em formato .doc, .docx ou .RTF.
4. o D.O.I. ou URL para as referências foi informado, quando disponível
5. O texto está em espaço duplo; usa uma fonte de 12-pontos; emprega itálico em vez de sublinhado (exceto em endereços URL)
6. O texto segue os padrões de estilo e requisitos bibliográficos descritos em Diretrizes para Autores, na página Sobre a Revista.

7. Em caso de submissão a uma seção com avaliação pelos pares (ex.: artigos), as instruções disponíveis em Assegurando a avaliação pelos pares cega foram seguidas.
8. Na carta ao Editor foram incluídos 3 nomes com os respectivos emails de contato, como sugestão de avaliadores com expertise para analisar o manuscrito.

IMPORTANTE: Os avaliadores sugeridos devem ser doutores e com publicações nos últimos três anos

9. Se pertinente, em material e método foi informado o número do protocolo de aprovação por comitê de ética
10. Os metadados estão completamente preenchidos, com o endereço completo da instituição de origem de cada autor

