

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE FARMÁCIA

Gabriela Thomas da Silva

NANOEMULSÃO DE USO TÓPICO CONTENDO EXTRATO DE *Achyrocline*
satureioides: EFEITO DO NÚCLEO OLEOSO SOBRE AS PROPRIEDADES FÍSICO-
QUÍMICAS E LIBERAÇÃO DE FLAVONOIDES

Porto Alegre

2013

Gabriela Thomas da Silva

NANOEMULSÕES DE USO TÓPICO CONTENDO EXTRATO DE *Achyrocline*
satureioides: EFEITO DO NÚCLEO OLEOSO SOBRE AS PROPRIEDADES FÍSICO-
QUÍMICAS E LIBERAÇÃO DE FLAVONOIDES

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

Orientador: Prof. Dr. Helder Ferreira Teixeira

Co-orientadora: Dra. Juliana Bidone

Porto Alegre

2013

Este artigo foi elaborado segundo as normas da revista “Latin American Journal of Pharmacy” apresentadas em anexo.

NANOEMULSÕES DE USO TÓPICO CONTENDO EXTRATO DE *Achyrocline*
satureioides: EFEITO DO NÚCLEO OLEOSO SOBRE AS PROPRIEDADES FÍSICO-
QUÍMICAS E LIBERAÇÃO DE FLAVONOIDES

Gabriela T. da Silva* ¹, Juliana Bidone ², Helder F. Teixeira ^{1,2}

¹ *Curso de Farmácia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Av. Ipiranga 2752,
90610-000, Porto Alegre, Brasil.*

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

*Autor correspondente. E-mail: gabrielat88@yahoo.com.br (G.T. da Silva)

Resumo

Neste estudo foi proposta a obtenção de nanoemulsões de uso tópico utilizando TCM, óleo de argan, abacate, amêndoas doce, semente de uva e coco como núcleo oleoso, amplamente utilizados em formulações cosméticas. A influência do tipo de óleo foi avaliada através da caracterização físico-química das nanoemulsões, além de estudos de liberação e permeação cutânea usando células de difusão de Franz. A composição dos óleos influenciou significativamente nas características físico-químicas. Nanoemulsões com menor tamanho médio de gotícula e índice de polidispersão foram obtidas com TCM, óleo de coco e de amêndoas. Extrato etanólico de *Achyrocline satureioides* foi incorporado nessas nanoemulsões em concentração de flavonoides (quercetina, luteolina e 3-*O*-metilquercetina) equivalente a cerca de 1 mg/mL. A liberação da 3-*O*-metilquercetina a partir das formulações preparadas com óleo de coco e óleo de amêndoas ocorreu seguindo uma cinética de primeira ordem e alcançou cerca de 75 % em 8 horas. Na avaliação da retenção cutânea, maiores concentrações de luteolina e 3-*O*-metilquercetina foram obtidas com a nanoemulsão de óleo de amêndoas.

Palavras-chaves: *Achyrocline satureioides*, Nanoemulsões, Óleos vegetais.

Introdução

Nanoemulsões são dispersões coloidais formadas por um núcleo oleoso finamente disperso em uma fase aquosa, estabilizado por um sistema de tensoativos¹⁻³. As gotículas lipídicas possuem tamanho na escala nanométrica, geralmente na faixa de 20 – 500 nm^{4,5}, sendo que tamanhos inferiores a 100-200 nm acarretam em dispersões de aspecto translúcido e tamanhos superiores em dispersões de aspecto leitoso^{6,7}. Os sistemas nanoemulsionados têm sido estudados como promissores carreadores de fármacos, principalmente lipofílicos, pois sua utilização melhora os parâmetros de solubilidade, estabilidade e biodisponibilidade^{8,9}.

No preparo de formulações de uso tópico, as nanoemulsões representam um importante veículo para liberação de fármacos e ativos através da pele. As vantagens da utilização de nanoemulsões estão relacionadas principalmente ao tamanho reduzido das gotículas do núcleo oleoso, que proporcionam uma extensa superfície de contato com a pele, com a formação de um uniforme filme oclusivo^{3,8,10}. Assim há uma maior hidratação cutânea e, conseqüentemente, melhora na percepção de sensorial agradável¹¹. Tais aspectos, juntamente com a redução da tensão superficial do sistema, permitem uma penetração mais rápida de ativos. Além disso, as nanoemulsões são de fácil obtenção e possuem reduzido poder irritante, especialmente quando comparadas às microemulsões, por apresentarem baixa proporção de tensoativos^{1,3,10}.

Para o desenvolvimento de uma nanoemulsão adequada ao uso farmacêutico e cosmético se faz necessária a escolha correta dos componentes que irão compor o sistema, como óleos e tensoativos, bem como do método de preparação^{3,6,12}. Esses fatores interferem nas características físico-químicas das nanoemulsões, como tamanho médio de gotícula, índice de polidispersão e potencial zeta, que, por sua vez, influenciam na estabilidade da formulação, nas interações do sistema com a pele, e na liberação das moléculas a partir dos

carreadores^{13,14}. Com relação à estabilidade, de modo geral, diâmetros maiores de gotículas aumentam a probabilidade de ocorrência de fenômenos de floculação e cremagem. Quando o tamanho da gotícula é grande há existência de uma maior tensão superficial e a força repulsiva entre os glóbulos tende a ser menos intensa. Além disso, o movimento browniano de gotículas de tamanho reduzido supera a ação da gravidade, dificultando a formação de glóbulos^{6,10,15}. O potencial zeta também é uma medida que indica estabilidade, especialmente quando a única forma de estabilização é a existência de forças repulsivas¹⁶.

O potencial zeta reflete principalmente a composição de tensoativos e pode indicar, além da estabilidade, maior ou menor interação dos carreados com componentes cutâneos. Os tensoativos mais amplamente empregados são as lecitinas, que constituem misturas de fosfolipídeos de origem natural e atribuem carga negativa à interface de nanoemulsões^{1,17,18}.

Para a escolha do óleo, de modo geral, considera-se a solubilidade do ativo que se deseja incorporar, bem como as propriedades físico-químicas requeridas para a formulação, sendo esta dependente da via de administração^{17,19}. Parâmetros como a viscosidade do óleo e a composição de ácidos graxos podem interferir diretamente no diâmetro de gotícula, na polidispersão e na liberação de ativos a partir de nanoemulsões^{3,13,20}. A utilização de óleos vegetais em produtos cutâneos tem sido intensamente valorizada pelo fato de serem seguros, biocompatíveis e provenientes de fontes renováveis. Além disso, promovem um acréscimo nas propriedades de hidratação e proteção da pele, visto que os óleos naturais possuem caráter lipofílico com composição bastante diversificada, que engloba ácidos graxos, polifenóis, fitoesteróis e vitaminas, principalmente as vitaminas C e E^{7,21}. Muitos destes óleos vegetais têm sido considerados no desenvolvimento de nanoemulsões^{13,14}.

Dentre os derivados, o mais amplamente empregado são os triglicerídeos de cadeia média (TCM), obtido pela re-esterificação de ácidos graxos do óleo de coco ou de palma com a glicerina^{17,22,23}. Comparados aos triglicerídeos de cadeia longa, como óleo de soja, rícino e

oliva, possuem baixo peso molecular e reduzida viscosidade, além de serem bastante seguros²². Além disso, recentes estudos têm reportado a utilização de outros óleos vegetais, como palma²⁴, milho¹⁴, rosa²⁵, sementes de uva^{25,26}, amêndoas²⁶ no desenvolvimento de nanoemulsões de uso tópico. Nanoemulsões com óleo de semente de uva e de amêndoas foram utilizadas para carreamento da benzofenona²⁶, assim como nanoemulsões de óleo de palma foram utilizadas para incorporar tocoferol²⁴. O óleo de argan, por sua vez, foi avaliado no desenvolvimento de nanoemulsões para fármacos de baixa hidrossolubilidade, como diclofenaco²⁷.

Considerando que há uma ampla gama de moléculas de reduzida hidrossolubilidade com atividade farmacológica e/ou cosmética, torna-se imprescindível o estudo de diferentes sistemas nanoestruturados que viabilizem e aumentem a disponibilidade destas moléculas². Tão importante quanto, é a compreensão de algumas variáveis nos processos de desenvolvimento de sistemas na escala nanométrica^{3,10,15}. Neste ínterim, o presente trabalho teve como objetivo investigar a influência de diferentes óleos vegetais na preparação e nas propriedades físico-químicas de nanoemulsões óleo/água. Além disso, a fim de demonstrar a estabilidade e a capacidade de veicular do sistema, um extrato etanólico de *Achyrocline satureioides* (marcela ou macela) foi incorporado nas nanoemulsões. As inflorescências da marcela são amplamente utilizadas na medicina popular da América do Sul, e estudos com extratos etanólicos têm demonstrado atividades antioxidante, anti-inflamatória, anti-herpética e fotoprotetora, relacionadas principalmente aos três principais flavonoides quercetina (QCT), luteolina (LUT) e 3-*O*-metilquercetina (3-*O*-MQ)²⁸⁻³⁰. As agliconas de QCT, LUT e 3-*O*-MQ possuem reduzida hidrossolubilidade e sua incorporação em nanoemulsões pode viabilizar a utilização dos extratos da marcela no tratamento tópico de distúrbios cutâneos.

Materiais e Métodos

Materiais

Os óleos de semente de uva, amêndoas doce, abacate e triglicerídeos do ácido caprílico/cáprico (TCM) foram adquiridos a partir da importadora química Delaware (Porto Alegre, Brasil). Óleo de coco e óleo de argan foram doados por Galena Química e Farmacêutica LTDA (Campinas, Brasil). Lecitina de gema de ovo (Lipoid E-80[®]), polissorbato 80 e vitamina E foram obtidos a partir de Lipoid (Alemanha), Vetec (Brasil) e Evonik Degussa (Brasil), respectivamente. *Achyrocline satureioides* foi adquirida do CPQBA-UNICAMP (São Paulo, Brasil) e uma amostra da espécie foi depositada no herbário da mesma instituição (número 308). Orelhas de porco foram obidas da Ouro do Sul-Cooperativa dos Suinocultores do Caí Superior Ltda. Metanol (J.T. Baker, USA), acetonitrila (Tedia, Brasil) e ácido fosfórico (Merck, Alemanha) foram usados para as análises por cromatografia líquida de alta eficiência.

Condições Cromatográficas

A quantificação dos flavonoides QCT, LUT e 3-O-MQ nos óleos, no extrato de *A. satureioides*, nas nanoemulsões e nos estudos de liberação e permeação cutânea foi realizada por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) com método previamente validado por Bidone *et al.*³¹. O equipamento utilizado foi um Shimadzu LC-10A, equipado com bomba LC-10 AD, sistema controlador CBM- 10A, auto-injetor SIL-10 A e detector SPD-20AV UV/Vis (362 nm). Os parâmetros cromatográficos foram: coluna Synergi Polar-RP 150 x 4,6 mm i.d., 4 µm (Phenomenex, Torrance, CA) protegida por uma pré-coluna empacotada com sílica C18 Phenomenex (150 µm, 140 Å), temperatura de 30 ± 1°C, fluxo isocrático de 0,8 mL/min e volume de injeção de 20 µL. A fase móvel foi constituída por metanol:0,16 M

ácido fosfórico:acetonitrila (46:44:10 v/v/v) e todas as amostras foram diluídas em metanol:ácido fosfórico 16 mM (50:50, v/v) e filtradas antes das análises.

Caracterização dos óleos

Os óleos foram caracterizados com base em suas características organolépticas, densidade e viscosidade. Aspectos físicos como cor, transparência e odor foram avaliados macroscopicamente. A densidade foi determinada com auxílio de picnômetro à temperatura de 20-23°C. A viscosidade foi avaliada utilizando-se o viscosímetro rotacional Brookfield, modelo RVDV II+, com spindle 21, na velocidade de 200 rpm.

Solubilidade da quercetina nos óleos

A solubilidade da QCT em todos os óleos foi mensurada após saturação de uma determinada alíquota de TCM, óleo de coco, óleo de amêndoas doce, óleo de sementes de uva, óleo de abacate e óleo de argan. Resumidamente, em cerca de 2 mL de óleo foi acrescida um excesso de quercetina, sendo mantidos sob agitação e temperatura de 30 °C por 48 horas. Após este período, as amostras foram submetidas à centrifugação por 30 minutos a 10.000 rpm. Adequada diluição foi realizada e a solubilidade foi determinada através de cromatografia líquida.

Preparação do extrato de *Achyrocline satureioides*

As inflorescências da planta foram limpas manualmente e moídas em moinho de martelos. O extrato foi obtido através do processo de maceração, com agitação diária, em etanol absoluto, por um período de oito dias. A proporção planta:solvente foi de 7,5% (p/v). A solução extrativa foi separada do marco utilizando prensa hidráulica, sendo posteriormente filtrada e acondicionada ao abrigo da luz e do calor.

Determinação do teor de flavonoides na solução extrativa

O teor dos flavonoides QCT, LUT e 3-*O*-MQ nas soluções extrativas foi determinado por CLAE, conforme condições já mencionadas. A análise procedeu-se depois de adequada diluição utilizando etanol absoluto e diluente metanol: ácido fosfórico 16 mM (50:50, v/v).

Preparação das Nanoemulsões

As nanoemulsões foram preparadas pelo método de emulsificação espontânea, com incorporação da solução extrativa de *A. saturoioides* na fase orgânica como descrito por Carvalho *et al* ³². A fase orgânica foi composta por lecitina de gema de ovo, óleo, extrato etanólico de *A. saturoioides*, vitamina E e etanol, sendo esta vertida na fase aquosa, constituída de polissorbato 80 e água (Tabela 1), sob agitação magnética constante por 30 minutos. Seguiu-se à remoção do etanol através de evaporação sob pressão reduzida a 40°C e a formulação foi concentrada em 5 mL. A solução extrativa de *A. saturoioides* foi incorporada em um equivalente de 1% de resíduo seco ($251,70 \pm 10,86$; $154,08 \pm 6,61$ e $687,32 \pm 30,81$ µg/mL, de QCT, LUT e 3-*O*-MQ, respectivamente). Realizou-se também o preparo de amostras controle ou brancas, pela mesma técnica, porém sem a solução extrativa. Todas as formulações foram mantidas sob o abrigo de luz e calor.

Tabela 1: Composição das nanoemulsões contendo extrato de *A. saturoioides*.

Componente	Proporção (%)
Óleo (TCM, semente de uva, amêndoas doce, coco, abacate ou óleo de argan)	7,5
Vitamina E	0,5
Lecitina de gema de ovo	2
Polissorbato 80	1
Extrato (resíduo seco)	1
Água	qsp 100

Caracterização das Nanoemulsões

As formulações foram avaliadas de acordo com a sua aparência física, potencial- ζ , tamanho médio de gotícula e índice de polidispersão, nos dias 1 e 30. O potencial- ζ foi determinado por mobilidade eletroforética. O tamanho médio de gotícula e o índice de polidispersão foram analisados por espectroscopia de correlação de fótons, a 25°C. As formulações foram previamente diluídas em solução de NaCl 1mM e, então, as análises realizadas em Zetasizer Nano-ZS90 (Malvern Instruments, Inglaterra), em triplicata. Para as nanoemulsões brancas avaliou-se também o pH, por potenciometria.

Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC)

O óleo de coco e a sua respectiva nanoemulsão liofilizada foram avaliados por calorimetria exploratória diferencial para determinação da temperatura onde ocorre a transição de estado físico. As análises foram conduzidas utilizando-se o calorímetro DSC-60 (Shimadzu, Kioto, Japão) sob atmosfera dinâmica de nitrogênio (50 mL. min⁻¹). As amostras (2-4 mg) foram colocadas em cápsulas de alumínio e fechadas hermeticamente. As curvas DSC foram obtidas na faixa de temperatura de 17 a 100 °C, com razão de aquecimento de 5°C/min.

Teor de Flavonoides nas Nanoemulsões

A quantidade de flavonoides em cada formulação foi analisada por CLAE, nas condições previamente descritas. Para o preparo da amostra, pesou-se cerca de 0,250 g de cada formulação, em duplicata, procedendo-se a diluição em metanol e em solução diluente composta por metanol e ácido fosfórico 16 mM (50:50, v/v).

Estudo de Liberação a partir das Nanoemulsões

Para o estudo de liberação utilizou-se como marcador a molécula 3-*O*-MQ. Como método foram utilizadas as células de difusão do tipo Franz, com área superficial de 2,54 cm² e 10 mL de volume no compartimento receptor, abastecido com etanol:PBS (30:70). Membranas de éster de celulose (diâmetro do poro de 50 nm, Millipore) foram colocadas entre os compartimentos doador e receptor e as nanoemulsões foram dispostas sobre a membrana. A temperatura manteve-se controlada em 32 ± 1°C, e a agitação foi constante por 8 horas. Nos intervalos de 0.5, 1.0, 2.0, 3.0, 4.0, 5.0, 6.0, 7.0 e 8.0 horas, uma alíquota do fluído receptor foi retirada e quantificou-se o teor de 3-*O*-MQ por CLAE. Para determinação da cinética de liberação da 3-*O*-MQ a partir das formulações, os resultados foram ajustados nos modelos matemáticos de Higuchi, ordem-zero e primeira ordem, através das equações descritas abaixo:

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

$$Q = Q_0 + Kt \quad (\text{ordem zero})$$

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

No qual Q é a quantidade da droga liberada no tempo t , Q_0 é a concentração inicial da droga e K é a constante do modelo de liberação.

Estudo de permeação/retenção cutânea

Para o estudo de permeação/retenção cutânea foram utilizadas células de difusão de Franz, nas mesmas especificações descritas para o estudo de liberação. Cortes circulares de pele de orelha suína foram utilizados como barreira, sendo colocados na interface dos compartimentos doador e receptor. A quantidade de nanoemulsão aplicada sobre a pele foi de 500 µL e depois de transcorridas 8 horas, retirou-se 1 mL do fluído receptor para posterior

análise do teor de flavonoides por CLAE. No final do experimento, as peles foram removidas da célula de Franz, limpas, cortadas em pequenos pedaços e submetidas à extração de flavonoides com metanol (1 mL), usando ultrassom por 40 minutos. Os flavonoides retidos na pele foram expressos pela quantidade de cada flavonoide (ug) por área (cm²).

Análise Estatística

Os resultados foram expressos como média \pm desvio padrão, de três análises. Análise de variância (ANOVA) foi empregada para a comparação dos dados experimentais, sendo as diferenças identificadas pelo teste de Tukey, ao nível de significância de $p < 0,05$. Todas as análises foram conduzidas pelo Programa Action (Versão 2.5, São Paulo, Brasil).

Resultados e Discussões

Caracterização dos óleos

O aspecto físico dos óleos utilizados no preparo das nanoemulsões, bem como sua densidade e viscosidade encontram-se na Tabela 2. O óleo de coco por possuir em sua composição maior proporção de ácidos graxos saturados, como ácido láurico e mirístico^{33,34}, apresenta-se sólido a uma temperatura ambiente próxima a 22°C. No entanto, como o óleo de coco inicia o processo de fusão a 25°C^{23,35}, em média, foi considerado adequado para o preparo de nanoemulsões. Por outro lado, os demais óleos vegetais utilizados são ricos em ácidos graxos insaturados, como os ácidos oleico e linoleico nos óleos de abacate³⁶, de amêndoas doce³⁷, de argan³⁸ e óleo de sementes de uva³⁹. Com relação aos resultados de densidade, esta variou na faixa de 0,917 a 0,946 g/mL, demonstrando ser levemente superior para o TCM. Com relação aos resultados de viscosidade, os maiores valores foram obtidos para os óleos de argan, amêndoas doce e abacate, estando na faixa de 67,6 a 69,0 cP. O óleo de semente de uva apresentou viscosidade de 57,2 cP, enquanto os triglicerídeos do ácido

cáprico/caprílico (TCM) apresentou a menor viscosidade, de 27,5 cP. As diferenças encontradas estão relacionadas com a composição dos óleos, ou seja, com a estrutura e concentração dos triglicerídeos e ácidos graxos livres presentes. Os triglicerídeos do ácido cáprico/caprílico apresentam 90% de ácidos graxos saturados de cadeia curta e média, e os óleos vegetais podem apresentar mais de 80% de ácidos graxos insaturados de cadeia longa. Densidade e viscosidade não foram avaliadas para o óleo de coco, devido sua consistência à temperatura de análise (20-23°C).

Tabela 2: Avaliação do aspecto físico, densidade e viscosidade dos óleos vegetais.

Óleo	Aspecto físico (22 °C)	Densidade (g/ mL)	Viscosidade (cP)
TCM	Líquido viscoso incolor, odor característico	0,946	27,5
Amêndoas	Líquido viscoso amarelo escuro, odor característico	0,918	67,9
Semente de uvas	Líquido viscoso amarelo claro, odor característico	0,920	57,2
Abacate	Líquido viscoso amarelo claro, odor característico	0,918	69,0
Argan	Líquido viscoso incolor, odor característico	0,917	67,6
Coco	Sólido branco, odor característico	-	-

Solubilidade da quercetina nos óleos

A capacidade de solubilização da quercetina por cada óleo está representada na Figura 1. Como pode ser observado, o TCM solubiliza uma quantidade de QCT bastante superior aos demais óleos, cerca de 188 µg/mL. O óleo de coco saturou-se a uma concentração média próxima a 75 µg/mL e os demais óleos solubilizaram cerca de 50 µg/mL do flavonoide.

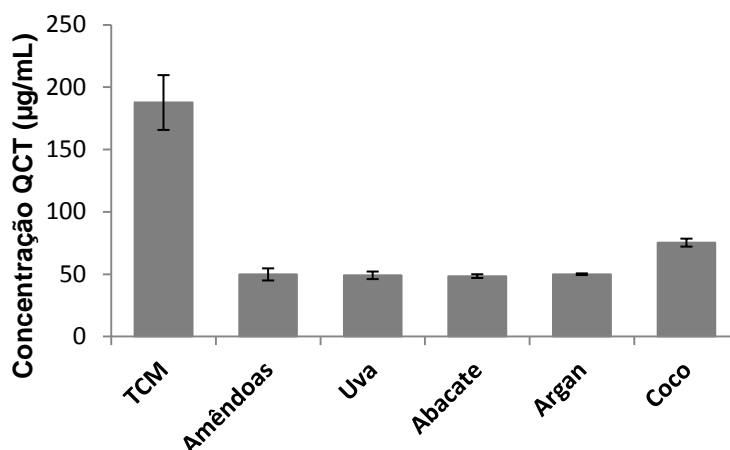


Figura 1: Solubilidade da QCT nos óleos.

A solubilidade do ativo que se deseja carrear é um dos parâmetros que geralmente se utiliza para a seleção do óleo que irá compor o núcleo oleoso da nanoemulsão, contudo, deve-se considerar também que a solubilidade dos compostos pode aumentar na presença de tensoativos. Além disso, a distribuição de moléculas de reduzida hidrossolubilidade em uma nanoemulsão ocorre tanto no núcleo oleoso como na interface óleo/água¹⁸.

Preparação e caracterização das nanoemulsões

As nanoemulsões brancas e contendo o extrato etanólico da marcela foram preparadas pelo método de emulsificação espontânea, que se mostrou adequado à obtenção de tais sistemas. Na tabela 3 podem ser visualizados os resultados obtidos para a caracterização físico-química das nanoemulsões brancas. Como pode ser observado, a nanoemulsão contendo núcleo oleoso TCM (NE-TCM) apresentou o menor diâmetro médio de gotícula (200 ± 20 nm), havendo diferença significativa ($p < 0,05$) em relação às demais formulações que apresentaram tamanho médio entre 256-320 nm. O reduzido tamanho obtido para NE-TCM é provavelmente decorrente da menor viscosidade do TCM em comparação aos outros óleos vegetais, como mencionado anteriormente. A formação dos glóbulos oleosos no

processo de preparo da nanoemulsão pode ser facilitada na presença de óleos menos viscosos²⁵. As formulações obtidas com óleo de amêndoas doce, sementes de uva, abacate, argan não demonstraram diferença significativa ($p > 0,05$) no tamanho médio de gotícula. As nanoemulsões preparadas com óleo de sementes de uva e de abacate apresentaram os maiores valores para o índice de polidispersão, próximos a 0,22, enquanto a NE-TCM apresentou o menor valor (0,06). No entanto, todas as formulações preparadas podem ser consideradas como monodispersas⁴⁰. Com relação aos resultados obtidos para o potencial- ζ , apresentaram-se negativos na faixa de -21,17 a -35,80 mV, devido à presença de fosfolipídeos carregados negativamente e de ácidos graxos livres na lecitina de gema ovo, e não houve diferença significativa entre nanoemulsões de diferentes núcleos oleosos ($p > 0,05$). Exceto para a formulação contendo óleo de argan, os valores de pH das nanoemulsões brancas ficaram próximos a 4- 4,55, e estão relacionados à composição das formulações. O pH considerado ideal para formulações de uso tópico é de 4,2 a 7,0, considerando o pH da pele⁴¹. No entanto deve-se ponderar que as nanoemulsões, de modo geral, são incorporadas em veículos semissólidos previamente à sua utilização, quando o pH final pode ser ajustado.

Tabela 3. Características físico-químicas das nanoemulsões brancas.

Óleo	Características das NE*			
	d (nm)	ipd	Potencial- ζ (mV)	pH
TCM	200 ± 20 ^a	0,06 ± 0,01 ^a	-21,17 ± 3,21 ^a	4,34 ± 0,88
Amêndoas Doce	287 ± 21 ^{b,c}	0,18 ± 0,04 ^{a,b}	-30,13 ± 4,62 ^a	4,29 ± 0,59
Semente de Uva	320 ± 16 ^c	0,22 ± 0,11 ^b	-32,60 ± 7,37 ^a	4,51 ± 0,33
Abacate	312 ± 28 ^c	0,22 ± 0,01 ^b	-24,10 ± 3,56 ^a	4,08 ± 0,60
Argan	319 ± 1 ^c	0,16 ± 0,004 ^{a,b}	-35,80 ± 6,22 ^a	3,55 ± 0,01
Coco	256 ± 10 ^b	0,14 ± 0,01 ^{a,b}	-32,10 ± 5,77 ^a	4,55 ± 0,86

*d: diâmetro médio de gotícula ± d.p., ipd: média do índice de polidispersão ± d.p., potencial- ζ : média do potencial- ζ ± d.p. Para cada parâmetro, os valores com as mesmas letras não apresentam diferença significativa (Teste de Tukey, $p \leq 0,05$), n=3.

Na tabela 4, por sua vez, estão dispostos os resultados obtidos na caracterização físico-química das nanoemulsões contendo extrato etanólico de *A. saturoioides*, em concentração equivalente a 1% de resíduo seco. Nota-se um aumento nos valores de tamanho médio de gotícula e de potencial- ζ em módulo com a incorporação do extrato, em todas as formulações. A complexidade de composição do extrato e a ampla distribuição dos compostos na estrutura da nanoemulsão (óleo/interface/água) permitem inferir que durante o processo de formação da nanoemulsão ocorram possíveis interações com os fosfolipídeos da lecitina, acarretando em gotas de maior diâmetro^{18,42}. O óleo que proporcionou a nanoemulsão com maior diâmetro médio foi o óleo de argan (374 nm). No entanto não demonstrou diferença estatística ($p>0,05$) em comparação aos valores obtidos para nanoemulsões contendo óleo de abacate, óleo de sementes de uva e óleo de amêndoas. Por outro lado, as nanoemulsões preparadas com TCM e óleo de coco apresentaram tamanhos médios inferiores, podendo estar relacionado à composição dos óleos que se baseia em ácidos graxos saturados de cadeia média. Além disso, como pode ser observado na Figura 1, a solubilidade da QCT é maior nos óleos TCM e de coco. Talvez este fato também contribua para a redução do tamanho, se for considerado que provavelmente uma maior fração do extrato estará solubilizada no núcleo oleoso e que haverá menos interferentes na interface da nanoemulsão. A dispersão de populações de gotículas foi satisfatória quando TCM, óleo de amêndoas doce, sementes de uva, argan e coco foram utilizados, no entanto, a utilização de óleo de abacate em nanoemulsões contendo extrato de marcela acarretou em um índice de polidispersão médio de 0,3. Para os dados de potencial- ζ , obteve-se uma variação de -33 a -40 mV. O aumento do potencial- ζ com relação às nanoemulsões brancas está de acordo com comportamento observado em estudos realizados por Zorzi⁴³ e Bidone *et al.*⁴², sendo atribuído à presença de componentes do extrato na interface da nanoemulsão, provavelmente de ácidos fenólicos⁴².

Tabela 4: Características físico-químicas das nanoemulsões contendo extrato de *A. saturoioides*.

Características das Extrato-NE*			
Óleo	d (nm)	i.p.d.	Potencial-ζ (mV)
TCM	307 \pm 11 ^a	0,12 \pm 0,01 ^a	-33,90 \pm 3,92 ^a
Amêndoas Doce	343 \pm 22 ^{a,b}	0,17 \pm 0,03 ^a	-40,63 \pm 3,69 ^a
Semente de Uva	358 \pm 19 ^b	0,17 \pm 0,03 ^a	-35,80 \pm 7,35 ^a
Abacate	365 \pm 12 ^b	0,29 \pm 0,12 ^a	-37,05 \pm 5,16 ^a
Argan	374 \pm 0,3 ^b	0,16 \pm 0,01 ^a	-40,35 \pm 3,75 ^a
Coco	305 \pm 17 ^a	0,13 \pm 0,004 ^a	-38,60 \pm 3,70 ^a

*d: diâmetro médio de gotícula \pm d.p., ipd: média do índice de polidispersão \pm d.p., potencial- ζ : média do potencial- ζ \pm d.p. Para cada parâmetro, os valores com as mesmas letras não apresentam diferença significativa (Teste de Tukey, $p \leq 0,05$), $n=3$.

Calorimetria Exploratória Diferencial

Tendo em vista que o óleo de coco apresenta-se sólido em temperaturas inferiores a 25°C, buscou-se verificar seu estado físico nas nanoemulsões utilizando a técnica de Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC). A Figura 2 exibe as curvas obtidas após análise térmica do óleo de coco e da nanoemulsão preparada com o óleo, sendo esta última liofilizada previamente à análise. Como pode ser observado, a curva DSC obtida para o óleo de coco indica um evento de fusão na faixa de 26,7 a 33,7°C, estando de acordo com o relatado na literatura⁴⁴. Por outro lado, tal evento endotérmico não é observado na curva DSC obtida para a nanoemulsão, demonstrando que o óleo não se encontra na forma sólida quando disperso no sistema nanoestruturado. O evento endotérmico visualizado em torno de 24°C pode ser decorrente de outros componentes do óleo de coco, visto que estes óleos são matérias-primas complexas, ou da interação dos lipídeos saturados do óleo com outros componentes da formulação. Além disso, devemos considerar a existência de uma mistura eutética entre os compostos da nanoemulsão, devendo realizar outros testes para confirmar o real comportamento do óleo de coco na formulação.

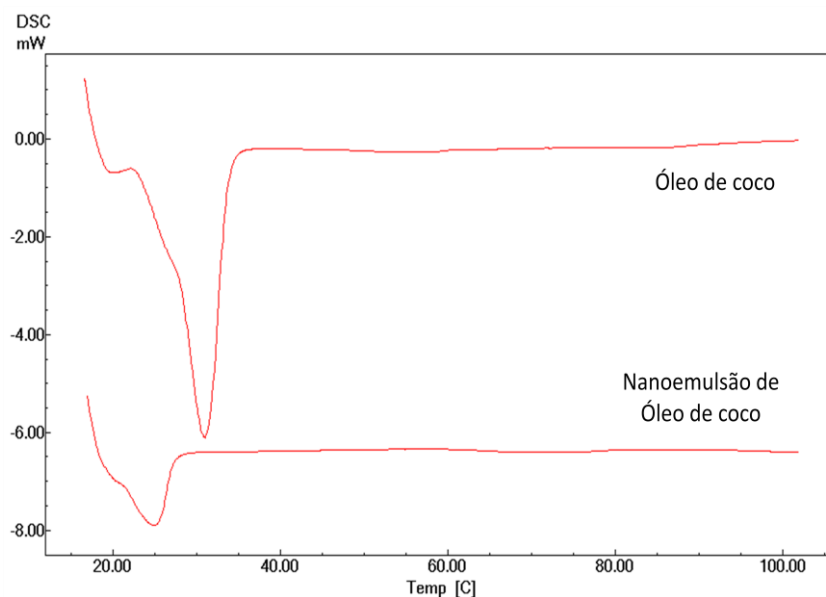


Figura 2. Curvas DSC do óleo de coco e da nanoemulsão contendo óleo de coco como núcleo.

Estudo preliminar estabilidade das nanoemulsões

As nanoemulsões preparadas com os diferentes tipos de óleos e contendo o extrato de marcela foram mantidas acondicionadas a 4 °C, e as suas características físico-químicas foram avaliadas após 30 dias. A avaliação visual das formulações demonstrou que após um mês inicia-se o processo de cremagem, com o aparecimento de gotas na superfície da nanoemulsão, mas sem a ocorrência de separação irreversível das fases. Tal fato não foi observado para a formulação NE-TCM, indicando talvez que a complexidade do óleo e a interação com componentes do extrato interfiram na estabilidade da nanoemulsão. Na figura 3 estão apresentadas as comparações de tamanho médio de gotícula, índice de polidispersão e potencial- ζ obtidos nos dias 1 e 30. Como pode ser observado, de modo geral não houve diferença significativa entre os parâmetros após 30 dias de armazenamento. Como exceção, o tamanho médio de gotícula obtido em 30 dias (365 nm) para as nanoemulsões preparadas com óleo de abacate foi significativamente inferior ($p < 0,05$) ao obtido no dia 1 (305 nm). Tal fenômeno poderia estar associado à existência de aglomerados de gotículas no dia 1 que se separam com o passar do tempo; o que também explicaria a redução do índice de

polidispersão de 0,3 para 0,17 em 30 dias. No entanto, um monitoramento mais detalhado deve ser realizado para verificar a causa da redução do tamanho e do índice de polidispersão das nanoemulsões com óleo de abacate. Além disso, apesar dos valores da caracterização físico-química das formulações terem se mantido semelhantes após 30 dias, o surgimento de cremagem indica a necessidade de um estudo de otimização dos óleos e tensoativos para melhorar a estabilidade das formulações.

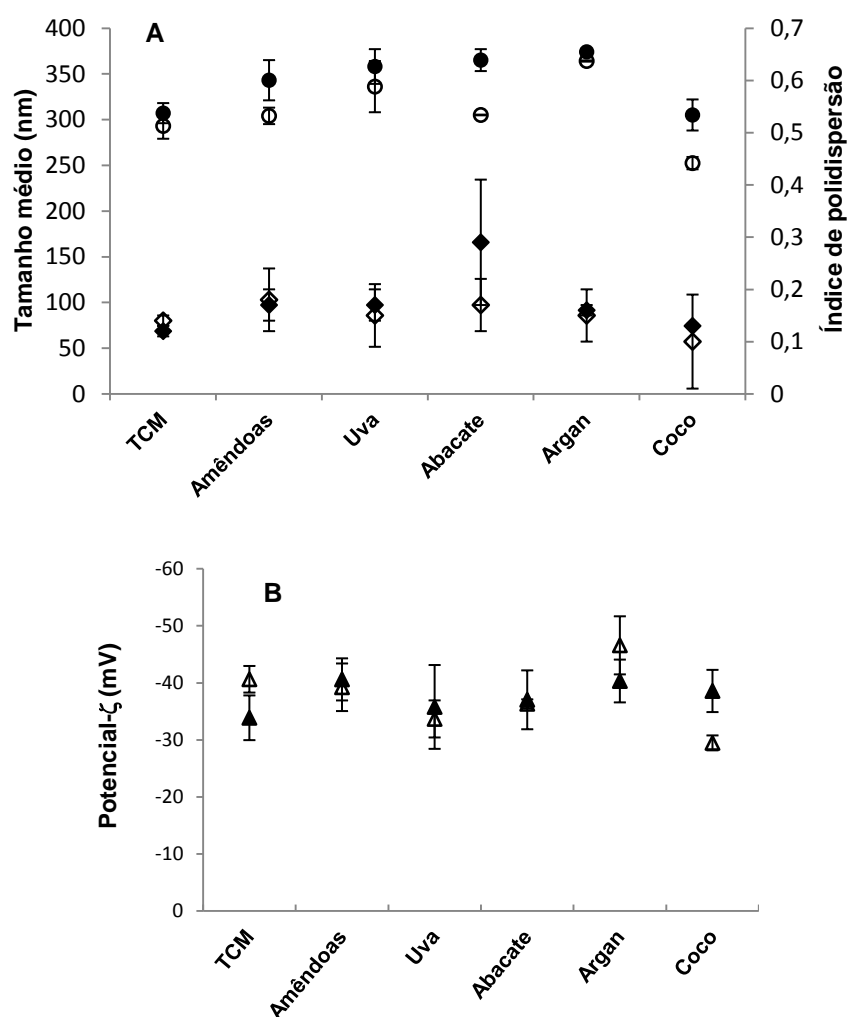


Figura 3: Comparação das características físico-químicas das nanoemulsões após 30 dias de armazenamento. (A) Tamanho médio de gotícula em dia 1 (●) e dia 30 (○) e índice de polidispersão em dia 1 (◆) e dia 30 (◇). (B) Potencial-ζ em dia 1 (▲) e dia 30 (△).

Teor de flavonoides nas nanoemulsões

Na tabela 5 estão apresentados os resultados de doseamento de QCT, LUT e 3-*O*-MQ nas diferentes formulações. As nanoemulsões apresentaram cerca de 1mg/mL de flavonoides, o que sugere uma elevada incorporação dos sistemas. Os resultados expressos como teor de flavonoides (%) em relação à quantidade inicial de extrato adicionada foram superiores a 92 %, independentemente do óleo utilizado no núcleo da nanoemulsão. Assim, pode ser verificado que a incorporação dos flavonoides não está apenas relacionada à sua solubilidade no óleo, considerando que todas as formulações foram semelhantes em termos de teor de flavonoides. Além do núcleo, a interface das nanoemulsões possui uma elevada capacidade de incorporação de compostos, que ficam solubilizados ou adsorvidos na camada de tensoativos^{18,40}.

Tabela 5. Teor de flavonoides (%) nas nanoemulsões contendo extrato de *A. satureioides*.

Óleo	Teor de flavonoides (%) [*]			Total de flavonoides [*]
	QCT	LUT	3- <i>O</i> -MQ	(µg/mL)
TCM	97,88 ± 1,79	98,04 ± 1,64	97,56 ± 1,69	1088,41 ± 25,89
Argan	92,69 ± 2,96	92,83 ± 3,06	92,01 ± 3,10	1025,77 ± 7,21
Semente de Uva	99,53 ± 6,49	99,51 ± 6,78	99,22 ± 6,92	1139,67 ± 57,40
Amêndoas Doce	95,09 ± 0,58	95,42 ± 0,59	95,74 ± 0,67	1084,95 ± 31,86
Abacate	95,61 ± 3,24	95,85 ± 3,16	95,35 ± 3,20	1044,38 ± 3,14
Coco	95,21 ± 3,75	95,45 ± 3,67	94,86 ± 3,76	1078,56 ± 17,56

* média ± d.p.

Estudo de liberação da 3-*O*-MQ

Para os estudos de liberação da 3-*O*-MQ foram escolhidas as formulações que demonstraram menor tamanho médio de gotícula e índice de polidispersão. Como as nanoemulsões de núcleo oleoso TCM contendo extrato de *A. satureioides* (1% de resíduo

seco) já possuem comportamento de liberação relatado em estudo prévio de nosso grupo de pesquisa, neste trabalho o estudo de liberação com células de difusão Franz foi realizado a partir das nanoemulsões preparadas com óleo de coco e de amêndoas. Os perfis de liberação mostrados na figura 4 indicam que cerca de 75 % de 3-*O*-MQ é liberada a partir de ambas formulações após 8 horas de estudo, com taxa de liberação bastante semelhante. Os resultados relatados por Bidone *et al.*⁴² mostraram uma liberação de cerca de 90 % de 3-*O*-MQ a partir de nanoemulsões de TCM. Como a diferença entre os resultados dos estudos não pode ser explicada pelas diferenças no tamanho médio de gotícula ou na solubilidade dos flavonoides nos óleos, sugere-se que a maior liberação demonstrada por Bidone *et al.*⁴² esteja relacionada com a presença de uma quantidade maior de extrato na formulação, correspondente em média a 1,3 mg/mL de flavonoides ou 750 µg/mL de 3-*O*-MQ. Esta suposição encontra respaldo nos resultados obtidos na avaliação da cinética de liberação, como mostra a tabela 6.

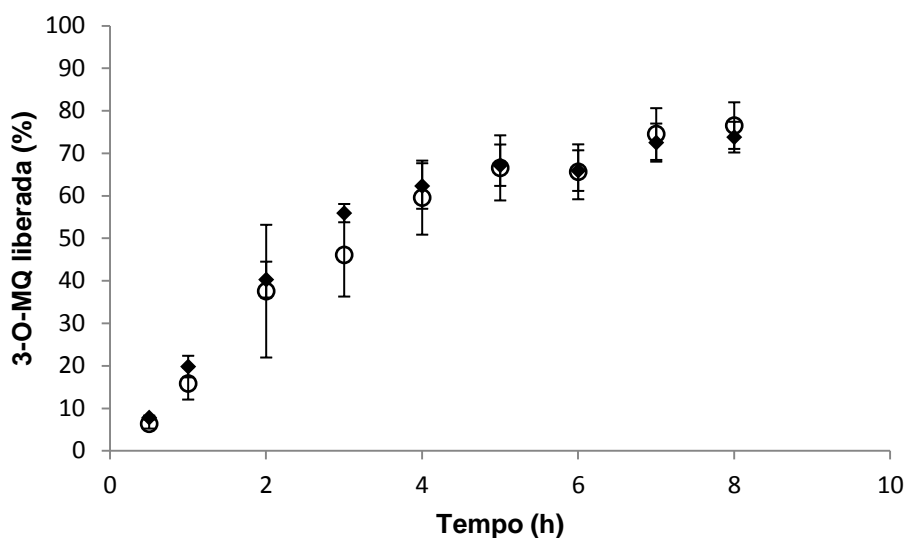


Figura 4. Perfil de liberação da 3-*O*-MQ a partir das nanoemulsões com óleo de coco (◆) e óleo de amêndoas doce (○).

O modelo matemático que apresentou maior valor de coeficiente de determinação (r^2) foi o de primeira ordem, para as duas formulações, indicando que a liberação é proporcional à concentração de flavonoide que permanece na formulação, e de tal modo que a quantidade de ativo liberado diminui com o tempo. De modo geral, a cinética de liberação a partir de sistemas nanoemulsionados tem sido descrita como de ordem zero ou primeira ¹⁷.

Tabela 6. Coeficientes de determinação (r^2) obtidos após ajuste da liberação da 3-*O*-MQ aos modelos matemáticos de ordem zero, primeira ordem e Higuchi.

Formulação	Coeficiente de determinação (r^2)		
	Ordem Zero	Primeira Ordem	Higuchi
NE-Coco	0,946	0,984	0,954
NE-Amêndoas	0,974	0,994	0,946

Estudo de permeação/retenção cutânea

O estudo de permeação/retenção cutânea *in vitro* foi realizado com células de difusão de Franz, utilizando peles de orelha de porco, a partir das formulações avaliadas no estudo de liberação. Na tabela 7 podem ser visualizadas as concentrações de QCT, LUT e 3-*O*-MQ extraídas da pele após 8 horas de estudo de permeação. Como pode ser observado, a retenção de LUT e 3-*O*-MQ na pele foi significativamente maior para a nanoemulsão de óleo de amêndoas ($p < 0,05$). Como o perfil de liberação a partir das formulações é muito semelhante, sugere-se que a diferença na retenção dos flavonoides esteja relacionada à composição dos óleos utilizados no núcleo das nanoemulsões. Os resultados de retenção cutânea de QCT, LUT e 3-*O*-MQ demonstrados em estudo prévio de Bidone *et al.* ⁴², a partir de nanoemulsão de TCM foram relativamente maiores do que os resultados obtidos neste estudo, provavelmente relacionado à maior liberação dos flavonoides a partir da formulação preparada por aqueles pesquisadores. A avaliação do fluido receptor após oito horas de ensaio

não indicou presença de flavonoides, estando de acordo com a literatura que mostra um pobre perfil de permeação dos flavonoides^{18,45}.

Tabela 7: Teor de flavonoides retidos na pele ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$) após 8 horas de estudo de permeação.

Formulação	Teor de flavonoides ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$)*		
	QCT	LUT	3-O-MQ
NE-coco	0,20 \pm 0,05	0,31 \pm 0,05 [#]	0,94 \pm 0,12 [#]
NE-amêndoas	0,21 \pm 0,08	0,46 \pm 0,04 [#]	1,37 \pm 0,12 [#]

*média \pm d.p. # diferença significativa de retenção entre as formulações (Tukey, $p \leq 0.05$).

Conclusões

A utilização de diferentes óleos vegetais como núcleo oleoso de nanoemulsões contendo extrato etanólico de *A. saturoioides* foi proposto neste trabalho. As nanoemulsões que apresentaram o menor tamanho de gotícula foram preparadas com TCM, óleo de coco e óleo de amêndoas doce. No entanto, todas apresentaram potencial zeta em torno de -40 mV, índice de polidispersão abaixo de 0,29 e elevada taxa de incorporação dos flavonoides quercetina, luteolina e 3-O-metilquercetina. O estudo de estabilidade indicou a necessidade de uma otimização com relação ao óleo e tensoativos utilizados, visto que após 30 dias de armazenamento houve o aparecimento de processo de cremagem. Tal aspecto não foi visualizado nas nanoemulsões com TCM.

Para as formulações preparadas com óleo de coco e óleo de amêndoas doce, a liberação da 3-O-metilquercetina ocorreu seguindo uma cinética de primeira ordem e alcançou cerca de 75 % em 8 horas. Na avaliação da retenção cutânea, maiores concentrações de luteolina e 3-O-metilquercetina foram retidas com a nanoemulsão de óleo de amêndoas. Ambas as formulações foram consideradas promissoras para utilização em produtos de uso tópico.

Referências

1. Aulton, M.E. (2005) “*Delineamento de Formas Farmacêuticas*”, Segunda Edição, Artmed, Porto Alegre, pp. 106-10.
2. Ostertag, F., J. Weiss & D.J. McClements (2012) *J. Colloid. Interf. Sci.* **388**: 95-102.
3. Bouchemal, K., S. Briançon, E. Perrier & H. Fessi (2004) *Int. J. Pharm.* **280**: 241-51.
4. Wulff-Pérez, M., A. Torcello-Gómez, M.J. Gálvez-Ruíz & A. Martín-Rodríguez (2009) *Food Hydrocolloid.* **23**: 1096-102.
5. Solè, I., A. Maestro, C.M. Pey, C. González, C. Solans & J.M. Gutiérrez (2006) *Colloid Surface A.* **288**: 138-43.
6. Solans, C., P. Izquierdo, J. Nolla, N. Azemar & M.J. Garcia-Celma (2005) *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.* **10**: 102-10.
7. McClements, D.J. & H. Xiao (2012) *Food Funct.* **3**: 202-20.
8. Beck, R., S. Guterres & A. Pohlmann (2011) “*Nanocosmetics and Nanomedicines: New approaches for skin care*”, Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, p. 296.
9. Shafiq, S., F. Shakeel, S. Talegaonkar, J. Ali, S. Baboota, A. Ahuja *et al.* (2007) *AAPS PharmSciTech.* **8**: E28.
10. Tadros, T., P. Izquierdo, J. Esquena & C. Solans (2004) *Adv. Colloid Interfac.* **108-109**: 303-18.
11. Fronza, T., S. Guterres, A. Pohlmann & H. Teixeira. (2007). “*Nanocosméticos: Em direção ao estabelecimento de marcos regulatórios*”, Editora UFRGS, Porto Alegre.
12. Gutiérrez, J.M., C. González, A. Maestro, I. Solè, C.M. Pey & J. Nolla (2008) *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.* **13**: 245–51.
13. Jumaa, M. & B.M. Müller (1998) *Int. J. Pharm.* **163**: 81-9.
14. Chung, H., T.W. Kim, M. Kwon, I.C. Kwon & S.Y. Jeong (2001) *J. Control. Release.* **71**: 339-50.

15. Koroleva, M.Yu., E.V. Yurtov (2012) *Russ. Chem. Rev.* **81**(1): 21-43.
16. Freitas, C., R.H. Müller (1998) *Int. J. Pharm.* **168** (2):221-9.
17. Bruxel, F., M. Laux, L.B. Wild, M. Fraga, L.S. Koester & H. F. Teixeira (2012) *Quim. Nova* **35** (9): 1827-40.
18. Fasolo, D., V.L. Bassani & H.F. Teixeira (2009) *Pharmazie* **64**: 726-30.
19. Araújo, F.A., R.G. Kelmann, B.V. Araújo, R.B. Finatto, H.F. Teixeira, L.S. Koester (2011) *Eur. J. Pharm. Sci.* **42**: 238-45.
20. Shakeel, F. & W. Ramadan (2010) *Colloid. Surface. B.* **75**: 356-62.
21. Patzelt, A., J. Lademann, H. Richter, M.E. Darvin, S. Schanzer, G. Thiede *et al.* (2012) *Skin Res. Technol.* **18**: 364-9.
22. Marten, B., M. Pfeuffer & J. Schrezenmeir (2006) *Int. Dairy J.* **16**: 1374-82.
23. "Types and classifications of coconut oils". Available at (<http://virginoildecococreame.com/types-classifications-of-coconut-oils/>). Acessado em: 01/11/2013.
24. Teo, B.S.X., M. Basri, M.R.S. Zakaria, A.B. Salleh, R.N.Z.R.A. Rahman & M.B.A. Rahman (2010) *J. Nanobiotechnology* **8**:4.
25. Contri, R.V., K.L.F. Ribeiro, L.A. Fiel, A.R. Pohlmann & S.S. Guterres (2012) *J. Exp. Nanosci.* p.1-12.
26. Almeida, J.S., L. Jezur, M.C. Fontana, K. Paese, C.B. Silva, A.R. Pohlmann *et al.* (2009) *Lat. Am. J. Pharm.* **28** (2): 165-72.
27. Lococo, D., C.E. Mora-Huertas, H. Fessi, I. Zaanoun & A. Elaissari (2012) *J. Biomed. Nanotechnol.* **5**: 843-8.
28. Polydoro, M., K.C.B. Souza, M.E. Andrades, E.G. Da Silva, F. Bonatto, J. Heydrich *et al.* (2004) *Life Sci* **74** (23): 2815-26.

29. Arredondo, M.F., F. Blasina, C. Echeverry, A. Morquio, M. Ferreira, J.A. Abin-Carriquiry *et al.* (2004) *J. Ethnopharmacol.* **91**(1): 13-20.
30. Retta, D., E. Dellacassa, J. Villamil, S. A. Suárez & A.L. Bandoni. (2012) *Ind. Crop. Prod.* **38**: 27-38.
31. Bidone, J., V.C. Bica, P.R. Petrovick, L.S. Koester, C.M.O. Simões, V.L. Bassani *et al.* (2013) *Pharmazie*. Aceito para publicação.
32. Carvalho, E.L.S., G.K. Zorzi, G.L.V. Poser, H.F. Teixeira, J.C.F. Moreira & V.L. Bassani (2008). (PI0805156-9).
33. Marina, A.M., Y.B. Che Man & I. Amin (2009) *Trends Food Sci. Tech.* **20**: 481-7.
34. Jayadas, N.H., K.P. Nair (2006) *Tribol. Int.* **39**: 873-8.
35. Farmacopeia Britânica (2009) Comissão da Farmacopeia Britânica, Londres, Reino Unido.
36. Berasategi, I., B. Barriuso, D. Ansorena & I. Astiasarán (2012) *Food Chem.* **132**: 439–46.
37. Mezzomo, N., B.R. Mileo, M.T. Friedrich, J. Martínez & S.R.S. Ferreira (2010) *Bioresource Technol.* **101**: 5622–32.
38. Charrouf, Z. & D. Guillaume (2008) *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* **110**: 632–6.
39. Dalmolin, I., M.A. Mazutti, E.A.C. Batista, M.A.A. Meireles & J.V. Oliveira (2010) *J. Chem. Thermodyn.* **42**: 797–801.
40. Müller, R.H., S. Schmidt, I. Buttle, A. Akkar, J. Schmitt & S. Brömer (2004) *Int. J. Pharm.* **269**: 293–302.
41. SOUZA, V. “*Anatomia, histologia e fisiologia da pele.*” Available at (<http://www.ativosdermatologicos.com.br/site/informe/mostra.php?id=56>). Acessado em: 01/11/2013.

42. Bidone, J., G.K. Zorzi, E.L.S. Carvalho, C.M.O. Simões, L.S. Koester, V.L. Bassani *et al.* (2013) *Em preparação*.
43. Zorzi, G.K. (2007) “*Nanoemulsões contendo solução extrativa de Achyrocline satureioides: formulação, permeação cutânea e atividade antioxidante*”. Dissertação de Mestrado. Programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 100p.
44. Tipvarakarnkoon, T., R. Blochwitz & B. Senge (2008). “*Rheological properties and phase change behaviors of coconut fats and oils*” In: “Annual Transactions of the Nordic rheology Society”, vol. **16**: 159-66.
45. Kreilgaard, M. (2002) *Adv. Drug Deliver. Rev.* **54** (1): S77-S98.

LISTA DE LEGENDA DAS TABELAS

Tabela 1: Composição das nanoemulsões contendo extrato de *A. saturoioides*.

Tabela 2: Avaliação do aspecto físico, densidade e viscosidade dos óleos vegetais.

Tabela 3. Características físico-químicas das nanoemulsões brancas.

Tabela 4: Características físico-químicas das nanoemulsões contendo extrato de *A. saturoioides*.

Tabela 5. Teor de flavonoides (%) nas nanoemulsões contendo extrato de *A. saturoioides*.

Tabela 6. Coeficientes de determinação (r^2) obtidos após ajuste da liberação da 3-O-MQ aos modelos matemáticos de ordem zero, primeira ordem e Higuchi.

Tabela 7: Teor de flavonoides retidos na pele ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$) após 8 horas de estudo de permeação.

LISTA DE LEGENDA DAS FIGURAS

Figura 1: Solubilidade da QCT nos óleos.

Figura 1. Curvas DSC do óleo de coco e da nanoemulsão contendo óleo de coco como núcleo.

Figura 3: Comparação das características físico-químicas das nanoemulsões após 30 dias de armazenamento. (A) Tamanho médio de gotícula em dia 1 (●) e dia 30 (○) e índice de polidispersão em dia 1 (◆) e dia 30 (◇). (B) Potencial- ζ em dia 1 (▲) e dia 30 (△).

Figura 4. Perfil de liberação da 3-*O*-MQ a partir das nanoemulsões com óleo de coco (◆) e óleo de amêndoas doce (○).

Manuscript Preparation

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

Manuscripts in general should be organized in the following order:

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

- *Conclusions (at the author's discretion)*: must not reiterate any discussion or introductory comments, they must be genuine conclusions drawn from the results of the study.
- *Acknowledgements* and any additional information concerning research grants, etc.
- *References*: will be numerated correlatively as they are cited in the text and listed separately under the title "References" (please use a hanging indent: second and subsequent lines indented). The style used for citation of articles in journals (1), monographs (2), chapters in books (3), and internet references (4) which must be strictly observed, is given in the following examples:

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

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

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

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

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