

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
Faculdade de Farmácia
Disciplina de Trabalho de Conclusão de Curso

**Preparação e Caracterização de Hidrogéis Contendo Ácido Rosmarínico
Incorporado em Nanoemulsões para Aplicação Tópica**

Paula Marafon

Porto Alegre, Julho de 2017

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
Faculdade de Farmácia
Disciplina de Trabalho de Conclusão de Curso

**Preparação e Caracterização de Hidrogéis Contendo Ácido Rosmarínico
Incorporado em Nanoemulsões para Aplicação Tópica**

Paula Marafon

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado como requisito parcial para
a obtenção do título de Farmacêutico,
pelo curso de Farmácia da Universidade
Federal do Rio Grande do Sul.

Orientador: Prof. Helder Ferreira Teixeira

Co-orientadora: Flávia Nathiely Silveira
Fachel

Porto Alegre, Julho de 2017

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Helder Ferreira Teixeira pelos conselhos, ensinamentos e orientações durante todo o período de estudo.

À doutoranda Flávia Fachel pela co-orientação, paciência, conselhos, estímulo e apoio durante a realização deste trabalho.

Aos doutorandos e mestrandos do Laboratório de Desenvolvimento Galênico pela convivência, apoio e xícaras de café.

Às colegas e amigas que tive o privilégio de conhecer durante o período de graduação e que compartilharam comigo cada vitória e tropeço durante a jornada acadêmica.

À Lia, Patrícia e Stephani pelo ombro amigo, conversas, descontração e gordices de sempre.

Aos amigos que tive a sorte de conhecer durante o intercâmbio, em especial à Mônica Tonello por embarcar nessa aventura comigo.

Ao Filipe, meu namorado, pelo astral incrível, por acreditar no meu potencial e por me tranquilizar em todos os momentos.

Agradeço a minha família, especialmente meus pais, Clarice e Antélio, pelo incentivo, compreensão, paciência e amor incondicional. À minha irmã, Patrícia, por comemorar comigo cada meta atingida e por alegrar os meus dias.

Muito obrigada!

APRESENTAÇÃO

O presente trabalho foi escrito em formato de artigo científico, segundo as normas de publicação do *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*, as quais se encontram anexadas no fim deste trabalho (Anexo 1).

Preparação e caracterização de hidrogéis contendo ácido rosmarínico incorporado em nanoemulsões para aplicação tópica

Paula Marafon^a, Flávia Nathiely Silveira Fachel^b, Helder Ferreira Teixeira^{a,b*}

^aFaculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil.

^bPrograma de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil.

*Autor correspondente: Tel.: (+55) 51 3308 5231; fax: (+55) 51 3308 2165. E-mail: helder.teixeira@ufrgs.br (Helder Ferreira Teixeira).

RESUMO

Recentemente, o Ácido Rosmarínico (AR) vem sendo estudado como uma opção de ativo cosmético de origem natural para combater os efeitos do envelhecimento, devido ao seu alto potencial antioxidante. Entretanto, visando contornar a instabilidade, as possíveis incompatibilidades e viabilizar seu uso tópico, a incorporação do AR em sistemas nanotecnológicos veiculados em hidrogéis representa uma opção relevante. Neste contexto, esse estudo teve como objetivo preparar e caracterizar hidrogéis de hidroxietilcelulose contendo AR incorporado em nanoemulsões, bem como, avaliar os perfis de liberação e retenção/permeação em pele suína. Na caracterização físico-química das formulações, observou-se que as nanoemulsões espessadas (contendo AR 1mg/mL) mantiveram as características originais, com tamanho de gotícula entre 170-250 nm, monodispersos e com potencial zeta superior a -30 mV. Essas mostraram-se similares ao longo de 90 dias de avaliação. Quanto ao perfil de liberação, observou-se que os hidrogéis retardaram a liberação do AR. Em relação a retenção/permeação cutânea, o AR incorporado em nanoemulsão contendo polissorbato 80 e o de mesma formulação espessada em hidrogel de hidroxietilcelulose obtiveram os melhores resultados de retenção. Portanto, os resultados principais indicam que o uso de sistemas nanotecnológicos e agentes de viscosidade como a hidroxietilcelulose, auxiliam na permeação do AR, viabilizando seu uso tópico.

Palavras-chave: Ácido rosmarínico; nanoemulsão; hidrogel; perfil de liberação; retenção/permeação cutânea.

ABSTRACT

Recently, Rosmarinic Acid (RA) has been studied as an option of natural cosmetic active, to combat the effects of skin aging, due to its high antioxidant potential. However, in order to overcome its instability, incompatibilities and allow the topic use, hydrogel containing RA-loaded nanosystems emerge as a relevant approach. On this context, this study aimed to prepare and characterize hydrogel of hydroxyethylcellulose with RA incorporated in nanoemulsions, as well, evaluate the release and retention/permeation profiles in porcine skin. The physicochemical characterization showed that the thickened nanoemulsions with hydroxyethylcellulose maintained the original characteristics, with droplet size between 170-250 nm, monodispersed and a zeta potential over - 30 mV. The samples demonstrated to be stable during the 90 days of evaluation. Regarding to skin retention/permeation, the RA incorporated in nanoemulsion containing polisorbate 80 and the same formulation thickened with a hydroxyethylcellulose hydrogel, demonstrated the bests results in the retention study. Therefore, the main results demonstrate that the use of nanosystems and viscosity agent as hydroxyethylcellulose, assist in the RA permeation, allowing its topical use.

Key-words: Rosmarinic acid; nanoemulsion; hydrogel; release profile; skin retention/permeation.

1. INTRODUÇÃO

Nos últimos anos tem sido evidenciado que a população está optando por um estilo de vida mais natural e saudável [1, 2]. Conseqüentemente, isso tem gerado um aumento na busca por produtos de origem natural, sendo essa tendência observada tanto pela indústria farmacêutica quanto cosmética. Em paralelo a esse fato, o aumento da expectativa de vida populacional tem despertado a necessidade e o interesse constante dessas indústrias pelo desenvolvimento de novas formulações [3], visando o retardo dos efeitos provocados pelo envelhecimento, os quais são mais perceptíveis na pele [4].

Neste sentido, um composto que tem sido amplamente estudado como uma alternativa natural tanto para uso cosmético quanto farmacêutico é o ácido rosmarínico (AR) [5, 6], um composto polifenólico natural, derivado de um éster de ácido cafeico e ácido (3,4-diidroxifenil) láctico [7, 8]. O AR pode ser encontrado em várias espécies vegetais pertencentes, principalmente, as famílias Boraginaceae e Lamiaceae, tais como: alecrim (*Rosmarinus officinalis* L.), menta (*Mentha* spp.) e erva cidreira (*Melissa officinalis* L.) [9]. Recentemente, vários estudos têm evidenciado que o AR apresenta inúmeras propriedades biológicas, tais como: adstringente, antiinflamatória, antimutagênica, neuroprotetora, antibacteriana, antiviral e antioxidante [7, 8, 10–12]. Adicionalmente, diversos trabalhos também têm demonstrado as várias possibilidades de utilização do AR. Hossain et al. [9] demonstraram que a aplicação tópica de AR pode prevenir e reverter os efeitos do câncer de pele, enquanto, Pattage et al. [13] sugerem que o AR combate danos celulares causados pela radiação UVB.

O processo de envelhecimento tem como uma das suas principais causas a produção exacerbada de radicais livres e outras espécies reativas de oxigênio (EROs), provenientes tanto do desequilíbrio do metabolismo oxidativo natural do organismo, quanto motivados por fatores externos, como a alta exposição à radiação UVB[14]. Especificamente, a formação de EROs representa um fator crucial para o envelhecimento da pele, devido à sua capacidade de destruir as células epiteliais ao aumentar a peroxidação lipídica [15]. Em 1994, Huang et al. [6] demonstraram que o extrato de alecrim (*Rosmarinus officinalis* L.) contendo alta concentração de AR foi capaz de combater a peroxidação lipídica. Isso se deve, principalmente, ao seu potencial antioxidante, a qual representa uma das suas atividades biológicas de maior reconhecimento e destaque, tendo em vista, sua alta capacidade de combater radicais livres [3]. Considerando que ativos antioxidantes são amplamente empregados pela indústria cosmética, e o fato de que atualmente a maioria das formulações antiidade tem como mecanismo de ação principal o combate a esses radicais livres, pode-se dizer, portanto, que o referido composto apresenta grande valia e potencial no combate às conseqüências do envelhecimento e os seus danos causados a pele [13].

Em contrapartida, apesar de ativos de origem natural, como o AR, estarem associados a uma maior segurança e efetividade, os mesmos apresentam algumas desvantagens, entre elas, podemos citar: instabilidade (à temperatura, pH, luz e oxidação), e, maiores chances de baixa permeabilidade e incompatibilidade com componentes da formulação ou até mesmo com o local de aplicação [1, 5]. Como

consequência, muitas vezes, esses fatores podem ser considerados as causas da diminuição e/ou perda de efetividade do produto e do comprometimento da formulação. Por esse motivo, esses compostos ainda representam um grande desafio para a indústria farmacêutica e cosmética que, atualmente, tem estudado algumas estratégias, visando transpor essas limitações, como o uso de nanotecnologia [13].

Dentre os sistemas nanotecnológicos empregados, as nanoemulsões têm sido destacadas pelas inúmeras vantagens reportadas, como, o aumento da solubilidade de compostos insolúveis e o aumento da permeação/retenção de compostos na pele, visando aumentar a probabilidade de eficácia desses compostos [16]. Embora a existência dessas vantagens, as nanoemulsões apresentam uma baixa viscosidade, sendo conveniente a sua incorporação em formas farmacêuticas semissólidas com apropriada viscosidade para aplicação tópica [17]. Neste contexto, o presente trabalho objetivou preparar e caracterizar hidrogéis contendo ácido rosmarínico incorporado em nanoemulsões para aplicação tópica. O perfil de liberação do ácido rosmarínico, assim como, a retenção/permeação cutânea em pele suína, também foram investigadas nas formulações desenvolvidas.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. MATERIAIS

Padrão de ácido rosmarínico com pureza superior a 98% foi adquirido da Carbosynth Ltd. (Berkshire, Reino Unido). Acetonitrila, metanol e ácido trifluoroacético grau analítico foram obtidos da Tedia (Rio de Janeiro, Brasil). Água ultra-pura foi obtida por processo de osmose reversa, utilizando o equipamento Milli-Q (Millipore, Billerica, EUA). A lecitina de gema de ovo (Lipoid E-80®) e triglicerídeos de cadeia média foram adquiridos da Lipoid GmbH (Ludwigshafen, Alemanha). O polissorbato 80 (Tween® 80) foi obtido da Synth (São Paulo, Brasil). Os fosfatos de potássio monobásico e bibásico foram adquiridos da Nuclear (CAQ, São Paulo, Brasil). A hidroxietilcelulose (Natrosol™) foi obtida da Pharmedia®. As peles de orelhas suínas foram obtidas da Ouro do Sul - Cooperativa dos Suinocultores do Caí Superior Ltda. (Harmonia, Brasil).

2.2. DESENVOLVIMENTO DAS NANOEMULSÕES

As nanoemulsões foram preparadas em triplicata pelo método de emulsificação espontânea, como descrito previamente. Oito formulações foram preparadas: uma nanoemulsão contendo ácido rosmarínico (NAR), uma nanoemulsão contendo ácido rosmarínico e polissorbato 80 (NARtw), um hidrogel de hidroxietilcelulose contendo NAR (HNAR), um hidrogel de hidroxietilcelulose contendo NARtw (HNARtw), e quatro formulações controle, isentas de AR (NB, NBtw, HNB e HNBtw, respectivamente). Os componentes da fase oleosa, lecitina de gema de ovo 2,5% (p/v), triglicerídeos de cadeia média 6% (p/v), e ácido rosmarínico 0,2% (p/v), foram dissolvidos em etanol e, em seguida, vertidos na fase aquosa, contendo ou não polissorbato 80 1% (p/v), dependendo da formulação, sob agitação. O excesso de solvente orgânico foi eliminado por rota-evaporação sob pressão reduzida, à 40 °C. Após a preparação das

nanoemulsões, as mesmas foram espessadas em hidrogel de hidroxietilcelulose. Para tanto, uma solução de hidroxietilcelulose 2% (p/v) foi adicionada na nanoemulsão na proporção de 1:1, e submetida a agitação durante 15 minutos.

2.3. CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DAS FORMULAÇÕES

As nanoemulsões contendo AR e as nanoemulsões brancas foram caracterizadas, antes e depois do espessamento com hidrogel de hidroxietilcelulose, através da determinação do tamanho de gotícula, índice de polidispersão (IP), potencial zeta, pH e viscosidade. O tamanho de gotícula e IP foram determinados pela técnica de espalhamento de luz dinâmico, após apropriada diluição das amostras em água. O potencial zeta foi determinado por mobilidade eletroforética, após apropriada diluição das amostras em solução de cloreto de sódio 1 mM. Ambas as análises foram realizadas em triplicada utilizando o equipamento Zeta sizer Nano-ZS90® (Malvern Instruments, England). A determinação do pH foi realizada em potenciômetro com eletrodo para microvolumes (Digimed®) diretamente nas formulações. A determinação da viscosidade das nanoemulsões foi realizada através da técnica de viscosimetria capilar em viscosímetro de Ostwald, à 24 °C.

2.4. DETERMINAÇÃO DO AR POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ULTRA-EFICIÊNCIA

A determinação do AR nas formulações e nos estudos de liberação e permeação/retenção cutânea foi realizada, após apropriada diluição em uma solução de água e acetonitrila (80:20, v/v), através de cromatografia líquida de ultra-eficiência (CLUE) empregando um método previamente validado pelo nosso grupo de pesquisa. As análises foram realizadas utilizando um cromatógrafo *Shimadzu Prominence series* acoplado detector de arranjo de fotodiodos (DAD) e auto amostrador controlado pelo *software LC-solution* (Kyoto, Japan). Utilizou-se coluna C18 Kinetex (100 x 2.1 mm i.d.; 2.6 µm; Phenomenex, EUA) mantida à temperatura de 55° C. A fase móvel foi constituída por uma eluição isocrática de água e acetonitrila (83:17%, v/v) acidificada com 0,1% (v/v) de ácido trifluoracético. O fluxo foi de 0,55 mL/min e o detector de DAD foi ajustado em 330nm.

2.5. ESTABILIDADE DAS FORMULAÇÕES

As formulações HNAR e HNAR_{tw} foram submetidas a um estudo de estabilidade. Para tanto, as formulações foram acondicionadas em geladeira (4 ± 2 °C), e análises do tamanho médio de gotícula, IP, potencial zeta e o teor do fármaco foram realizadas após 24 horas, 48 horas, 72 horas, 7, 15, 30, 60 e 90 dias.

2.6. ESTUDOS DE LIBERAÇÃO *IN VITRO*

Os estudos liberação do AR *in vitro* de uma solução controle contendo propilenoglicol (PG) e das formulações na concentração de 1mg/mL de NAR, NAR_{tw}, HNAR e HNAR_{tw}, foram realizados em células de difusão do tipo Franz, empregando-se membranas sintéticas de éster de celulose com tamanho de poro de 50 nm

(Millipore®). As membranas foram hidratadas em tampão de fosfato de potássio pH 5,8 e posicionadas entre o compartimento doador e receptor da célula. A rotação e a temperatura foram ajustadas para 450 rpm e 32 ± 1 °C, respectivamente, e o compartimento receptor foi preenchido com 12 mL da mesma solução tampão, denominado fluido receptor. Alíquotas de 500 µl, para a solução controle e as nanoemulsões, e de 500 mg, para os hidrogéis, foram adicionadas no compartimento doador. O sistema foi, então, mantido em constante agitação por 8 horas e 1 mL do fluido receptor coletado de cada célula de hora em hora, sendo o mesmo volume de fluido repostado. As amostras foram filtradas e analisadas por CLUE empregando-se método previamente descrito no presente trabalho.

2.7. ESTUDOS DE RETENÇÃO/PERMEAÇÃO CUTÂNEA

Assim como os estudos de liberação *in vitro*, os estudos de retenção/permeação cutânea de PG, NAR, NARtw, HNAR e HNARtw também foram realizados em células de difusão do tipo Franz. Para tanto, empregou-se a pele retirada em forma circular de orelhas de suínos. As mesmas tiveram os pêlos removidos, sua espessura medida e foram armazenadas a -20°C. Nos dias dos experimentos, as peles foram reidratadas com tampão fosfato de potássio pH 7.4 e colocadas entre o compartimento doador e o receptor, o qual foi preenchido com 12 mL da mesma solução tampão. A rotação e a temperatura foram ajustadas para 450 rpm e 32 ± 1 °C, respectivamente. Alíquotas de 500 µl, para a solução controle e as nanoemulsões, e de 500 mg, para os hidrogéis, foram adicionadas em contato com a pele, em constante agitação durante 8 horas. Após transcorrido esse tempo, uma alíquota de fluido receptor foi retirada de todas as células, enquanto as peles foram secas com swab, retiradas das células, cortadas em pequenos pedaços e extraídas com 2 mL de metanol por 45 minutos em ultrassom. Essas amostras foram, então, filtradas e analisadas por CLUE empregando-se método previamente descrito no presente trabalho.

2.8. ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise estatística foi realizada utilizando-se análise de variância (ANOVA), seguida de teste de Tukey usando o *software GraphPad Prism 5*. Os resultados foram considerados significativos em $p < 0,05$.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DAS FORMULAÇÕES

Os resultados referentes a caracterização físico-química das formulações encontram-se compilados na Tabela 1. Pode-se observar, portanto, que todas as formulações obtiveram resultados de tamanho de gotícula compatível com nanoemulsões obtidas por processo de emulsificação espontânea, variando entre 170-250 nm [18–21]. Adicionalmente, verificou-se que todas as formulações também apresentaram características de sistemas monodispersos, obtendo IP inferior a 0,3

[17, 20]. Quanto ao potencial zeta, todas as formulações apresentaram valores negativos, fato esse que pode ser explicado pela presença de fosfolídeos carregados negativamente na lecitina de gema de ovo presente nas formulações, conforme descrito na literatura [20, 21]. De maneira geral, verificou-se que as formulações contendo hidroxietilcelulose mantiveram a tendência dos parâmetros verificados nas nanoemulsões. Além disso, foi constatado que tanto as nanoemulsões, quanto os hidrogéis apresentaram um valor superior a 30 mV, em módulo, sugerindo uma possível estabilidade de todas as formulações [22]. Entretanto, pode-se observar que os hidrogéis apresentaram uma leve diminuição do teor em comparação com NAR e NARtw, porém, sem apresentar diferença significativa ($p > 0,05$). Já com relação ao pH, as nanoemulsões contendo AR antes e depois do espessamento com hidroxietilcelulose apresentaram valores em torno de 3,80 e 5,30, respectivamente; em contrapartida, as formulações sem AR antes e depois do revestimento apresentaram valores aproximados de 4,70 e 5,80, respectivamente. Os resultados encontrados são adequados para aplicação tópica considerando que o pH da pele humana é levemente ácido, entre 4,6-5,8. Os dados comprovam, portanto, que as formulações analisadas são compatíveis com a via tópica, não havendo necessidade de ajuste de pH [23].

Tabela 1: Caracterização físico-química das formulações.

	Tamanho de gotícula (nm)	IP	Potencial zeta (mV)	Teor (%)	pH
NAR	207,50 ± 4,39	0,230 ± 0,036	-46,17 ± 3,90	107,69 ± 6,28	3,85 ± 0,07
NB	224,67 ± 2,31	0,135 ± 0,030	-42,30 ± 1,22	-	4,72 ± 0,07
NARtw	175,42 ± 4,34	0,123 ± 0,021	-39,65 ± 1,53	98,59 ± 2,12	3,83 ± 0,05
NBtw	180,10 ± 2,74	0,147 ± 0,027	-42,07 ± 2,61	-	4,73 ± 0,07
HNAR	214,17 ± 5,90	0,261 ± 0,052	-43,43 ± 3,47	100,79 ± 1,98	5,40 ± 0,05
HNB	246,13 ± 0,67	0,182 ± 0,025	-43,53 ± 1,27	-	5,64 ± 0,05
HNARtw	180,57 ± 1,82	0,150 ± 0,026	-41,55 ± 3,90	98,50 ± 3,59	5,31 ± 0,06
HNBtw	184,53 ± 1,12	0,134 ± 0,027	-44,83 ± 3,11	-	5,86 ± 0,04

Média ± DP para três replicatas.

DP = desvio padrão; η = viscosidade.

Para a avaliação da viscosidade das nanoemulsões, foi empregada a técnica de viscosimetria com viscosímetro de Ostwald a qual é comumente empregada nesse tipo de formulação. Com relação às nanoemulsões analisadas, apesar dos sistemas contendo Tween 80® apresentarem um valor maior de viscosidade, todas as amostras apresentaram resultados similares ao da água (0,915 cP, em 24°C) de, aproximadamente, 1,10, 1,11, 1,33 e 1,21 cP para NAR, NB, NARtw e NBtw, respectivamente. Logo, os sistemas nanotecnológicos analisados apresentam baixa viscosidade, o que dificulta a sua aplicação tópica. Esses dados demonstram, portanto, a necessidade do uso de um agente de viscosidade, sendo proposta a incorporação das formulações em hidrogel de hidroxietilcelulose.

3.2. ESTABILIDADE DAS FORMULAÇÕES

Para o estudo de estabilidade, os resultados são demonstrados nas Figuras 1, 2, 3 e 4, as quais fazem um comparativo entre as formulações HNAR e HNARtw. A

Figura 1 demonstra que ao longo dos 90 dias os tamanhos de gotícula das formulações mantiveram-se constantes, sendo os valores para HNARtw levemente inferiores, sugerindo o efeito do tensoativo não iônico utilizado nessa propriedade. Esse padrão também pode ser observado nos dados referentes ao IP das formulações (Figura 2), que apesar de ter apresentado uma maior variabilidade não apresentou diferença significativa ao longo do período analisado ($p>0,05$). Já na Figura 3, pode-se observar que no período de 24 horas o potencial zeta do HNAR e HNARtw aumentaram significativamente ($p>0,05$), comparado ao tempo zero obtido na caracterização físico química, e retornaram aos valores obtidos inicialmente após 15 dias, não interferindo na sua estabilidade, permanecendo constante dentro de uma faixa aceitável até os 90 dias (Figura 3). Essa oscilação inicial observada no valor do potencial zeta pode ser justificada pelo tempo, muitas vezes, necessário para a organização/distribuição das cargas na interface na formulação [24]. Já com relação ao teor, observou-se que o mesmo se manteve constante no tempo avaliado, com valores aproximados para ambos os hidrogéis (Figura 4).

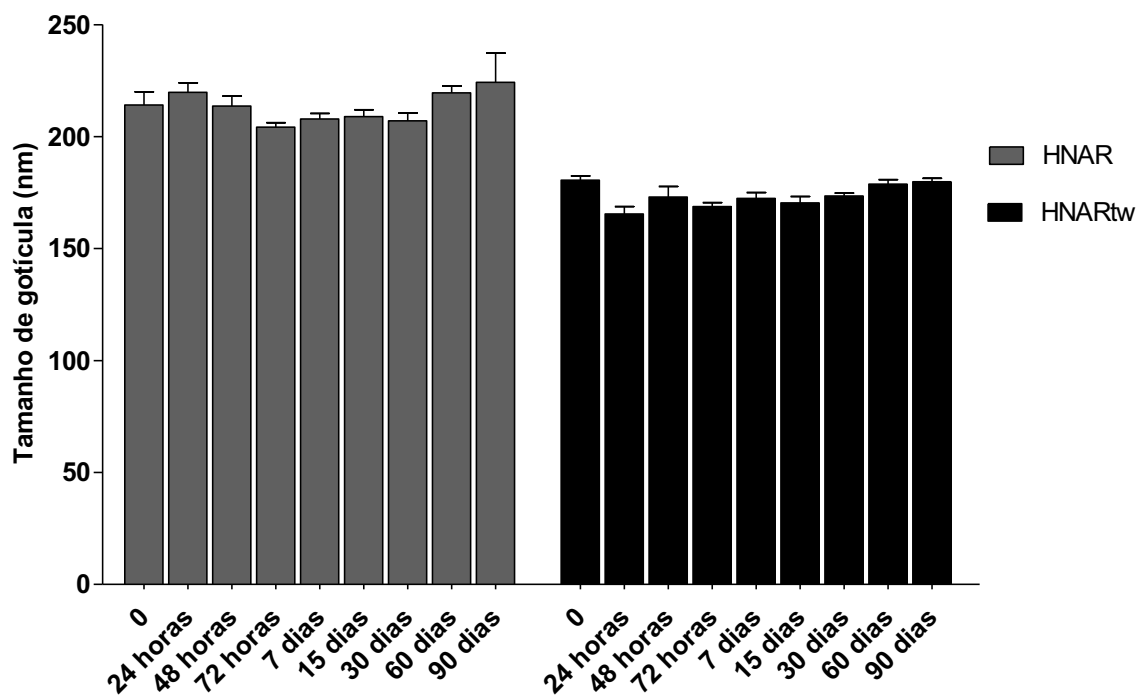


Figura 1. Variação do tamanho de gotícula durante o estudo de estabilidade.

Resultados expressos em: média \pm desvio padrão (triplicata).

Legenda: HNAR: hidrogel de hidroxietilcelulose contendo NAR; HNARtw: hidrogel de hidroxietilcelulose contendo NARtw.

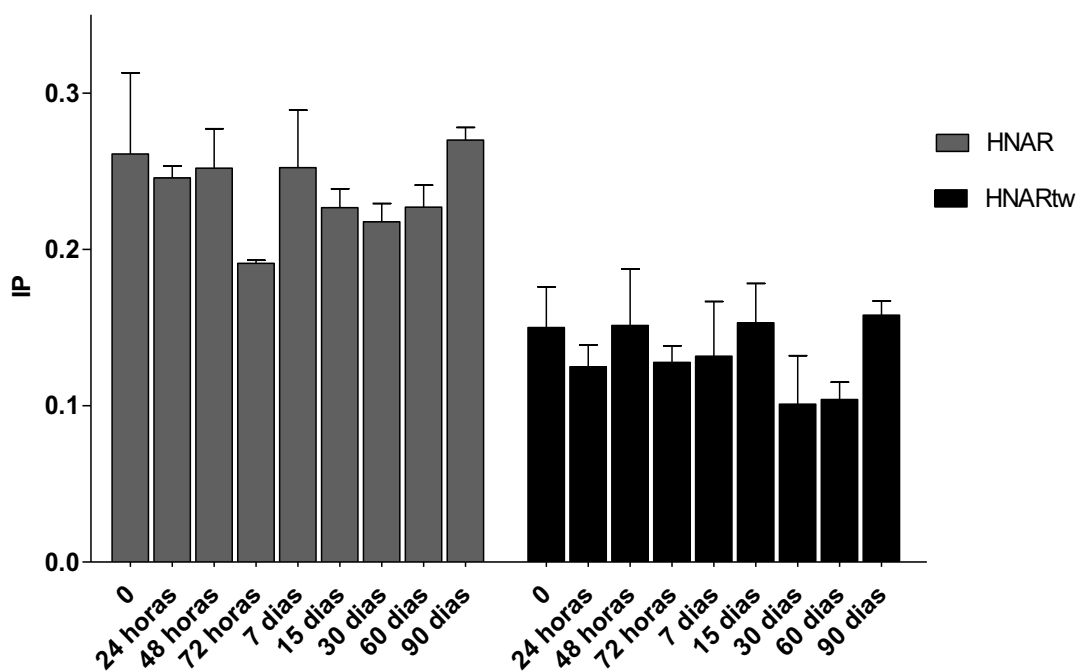


Figura 2. Variação do Índice de Polidispersão durante o estudo de estabilidade. Resultados expressos em: média \pm desvio padrão (triplicata).
 Legenda: HNAR: hidrogel de hidroxietilcelulose contendo NAR; HNARtw: hidrogel de hidroxietilcelulose contendo NARtw.

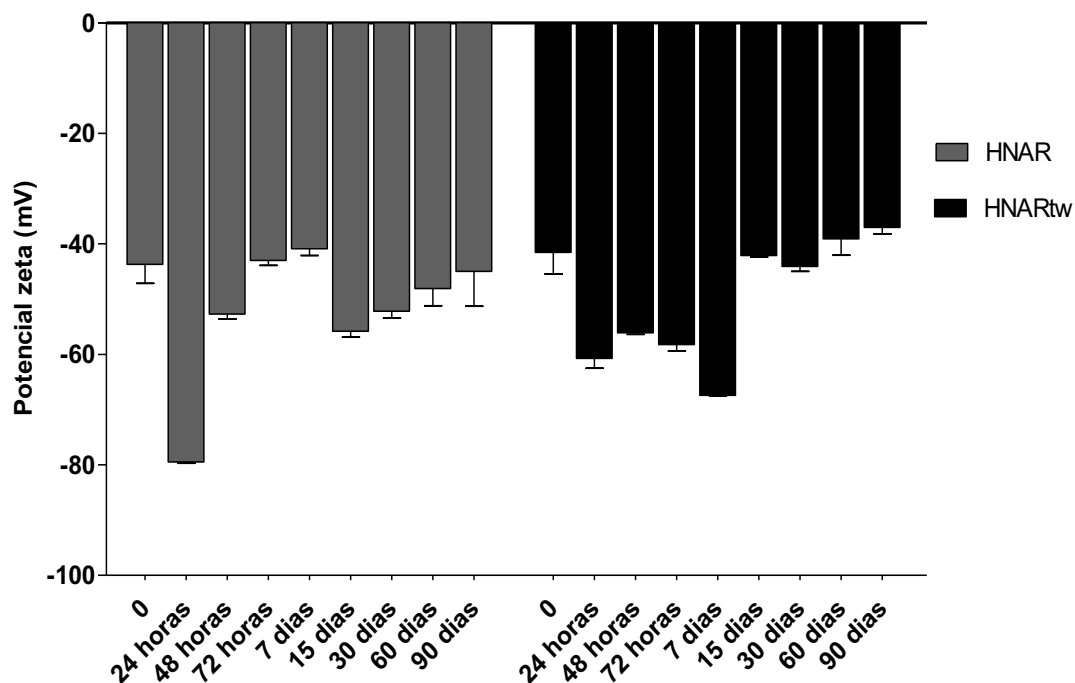


Figura 3. Variação do Potencial Zeta durante o estudo de estabilidade. Resultados expressos em: média \pm desvio padrão (triplicata).
 Legenda: HNAR: hidrogel de hidroxietilcelulose contendo NAR; HNARtw: hidrogel de hidroxietilcelulose contendo NARtw.

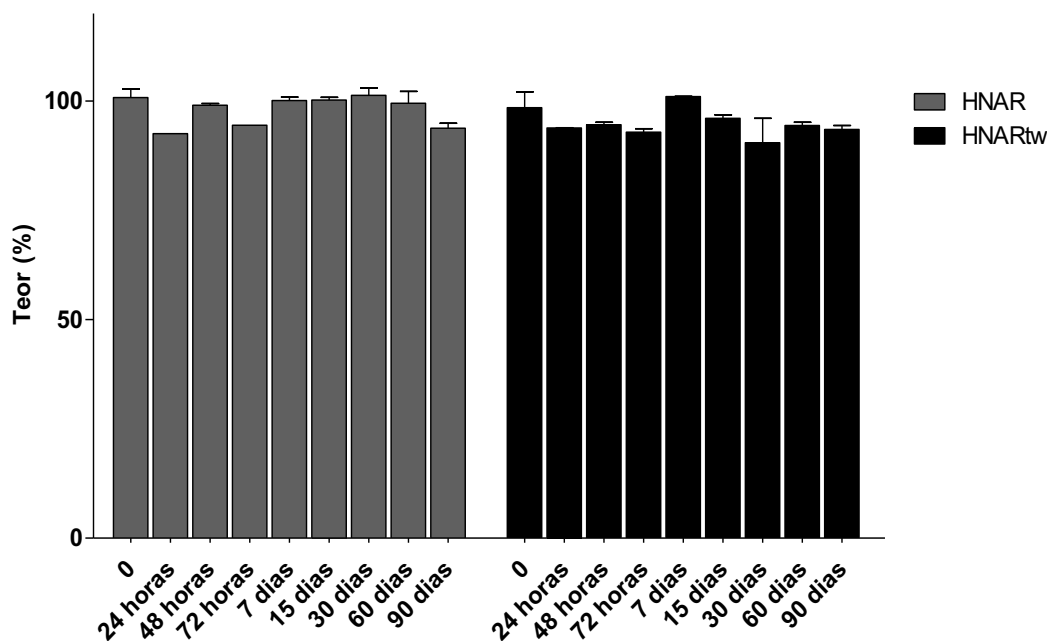


Figura 4. Variação do Teor durante o teste de estabilidade.

Legenda: HNAR: hidrogel de hidroxietilcelulose contendo NAR; HNARtw: hidrogel de hidroxietilcelulose contendo NARtw.

3.3. ESTUDOS DE LIBERAÇÃO *IN VITRO*

A Figura 5 mostra o perfil de liberação do controle com propilenoglicol e das formulações (NAR, HNAR, NARtw e HNARtw). Após 8 horas de experimento, o PG, NAR, HNAR, NARtw e HNARtw liberaram, aproximadamente, 98%, 75%, 62%, 72% e 57% de AR, respectivamente. Pode-se observar que as formulações apresentaram um perfil similar de liberação de AR, liberando menos AR em relação ao controle, sendo esse retardo na liberação das amostras um evento vantajoso, pois contribui com um efeito em longo prazo. No entanto, as nanoemulsões (NAR e NARtw) liberaram mais rapidamente em comparação com as formulações espessadas em hidrogéis (HNAR e HNARtw). Esse resultado pode ser justificado pela maior viscosidade das formulações contendo o agente espessante, caracterizando uma barreira difusional para a liberação do AR a partir dos hidrogéis. As nanoemulsões têm como uma de suas características a alta fluidez, o que inviabiliza o seu uso tópico, sendo muitas vezes necessária, a incorporação de um agente promotor de viscosidade, neste caso, o polímero hidroxietilcelulose [17]. Esse polímero, de características não iônicas, confere maior viscosidade para a formulação retardando a liberação do ativo e prolongando a presença do mesmo no local de interesse, o qual contribui para adequada ação do AR sobre a pele. Esse efeito é de grande relevância para posteriores estudos da atividade antioxidante das formulações propostas, visando à obtenção de um produto antienvhecimento.

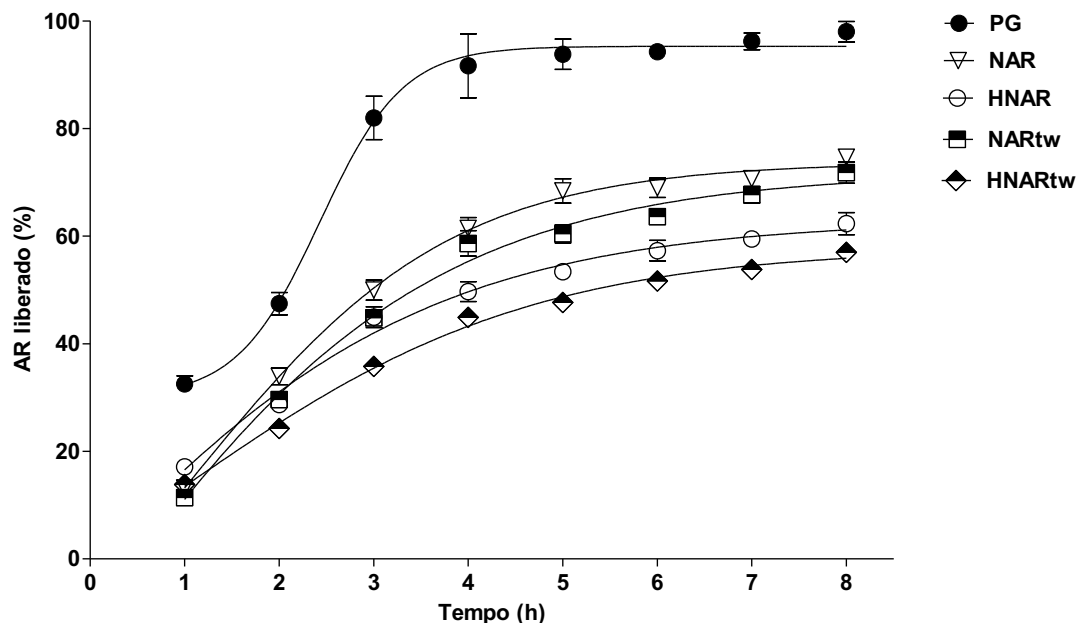


Figura 5. Perfil de liberação do AR do controle propilenoglicol e das formulações após 8 horas de estudo.

Resultados expressos em: média \pm desvio padrão (triplicata).

Legenda: PG: controle propilenoglicol contendo ácido rosmarínico; NAR: nanoemulsão contendo ácido rosmarínico; HNAR: hidrogel de hidroxietilcelulose contendo NAR; NARtw: nanoemulsão contendo ácido rosmarínico e polissorbato 80; HNARtw: hidrogel de hidroxietilcelulose contendo NARtw.

3.4. ESTUDOS DE RETENÇÃO/PERMEAÇÃO CUTÂNEA

Modelos animais são comumente empregados para avaliação do potencial de aplicação de formulações para via tópica [17] No presente estudo foi empregada pele de orelha suína para investigar a retenção/permeação cutânea, uma vez que Sekkat et al 2002 [25], validaram essa membrana como modelo de pele humana para estudos *ex vivo*, devido as suas similaridades morfológicas e considerações éticas. Na literatura, apenas um estudo descreveu a permeação cutânea de formulações semissólidas contendo extrato de *Melissa officinalis* L. em pele humana [26], sendo esta a primeira vez em que essa aplicação foi reportada para formulações contendo AR isolado em modelo animal.

Os resultados obtidos nos estudos de retenção/permeação cutânea podem ser verificados na Figura 6. Após as 8 horas de estudo, foi possível observar que, aproximadamente, 0,65 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$, 0,70 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$, 0,42 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$, 0,85 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ e 0,65 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ de AR ficaram retidos na pele total de orelha suína das formulações PG, NAR, HNAR, NARtw e HNARtw, respectivamente. Não sendo observada a presença de AR no fluido receptor. A nanoemulsão que apresentou resultado significativamente maior ($p < 0,05$) em relação as demais foi a nanoemulsão NARtw. Já para os hidrogéis, HNARtw permeou mais em relação a HNAR, sendo essa última a formulação que menos permeou nos estudos. Neste contexto, observa-se que a presença do polissorbato 80, promoveu uma maior permeação dentre as nanoemulsões e hidrogéis analisados. A partir desses resultados, percebe-se que os mesmos corroboram com

os resultados obtidos no estudo de liberação, onde as nanoemulsões apresentaram melhor desempenho em comparação com os hidrogéis. Entretanto, pode-se perceber um efeito positivo do polissorbato 80, o qual contribuiu para a permeação do ativo em ambos os tipos de formulação analisados, nanoemulsão e hidrogel. Adicionalmente, comparando os hidrogéis, já que os mesmos são mais favoráveis para aplicação tópica, as amostras contendo polissorbato 80 apresentaram um melhor desempenho, permeando aproximadamente 1,5x mais em relação à HNAR. O polissorbato 80 (Tween® 80), é um surfactante não-iônico amplamente empregado no desenvolvimento de cosméticos e medicamentos como promotor de permeação por ser econômico e de baixa toxicidade [27]. Akhtar et al. [28] demonstraram que surfactantes não-iônicos facilitam a permeação de compostos a partir de formulações tópicas por poderem emulsificar o sebo da pele e modificar algumas propriedades cutâneas, como o coeficiente de partição, aumentando sua permeabilidade através da infiltração na bicamada lipídica dessas células. Além disso, esse composto é capaz de deixar as camadas superficiais da pele mais frouxas, proporcionando a passagem do ativo. Esse comportamento do polissorbato 80 pode justificar o melhor desempenho do NARtw e HNARtw no estudo de permeação realizado.

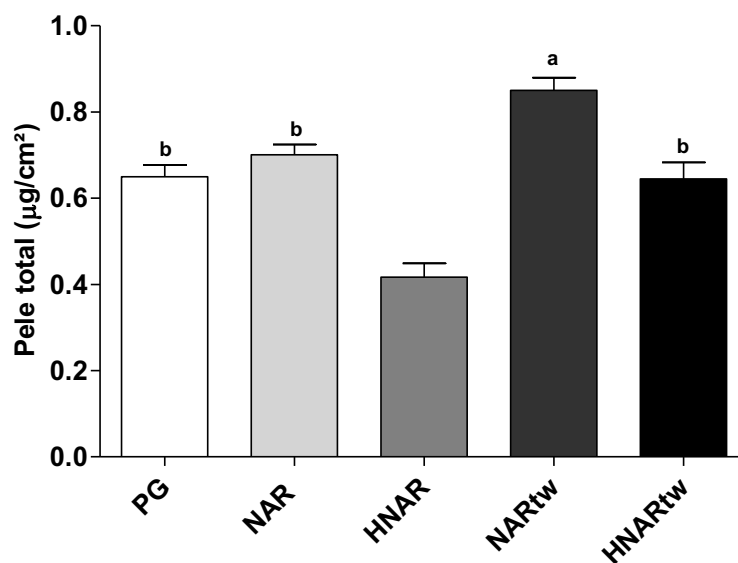


Figura 6. Perfil de retenção cutânea no controle propilenoglicol e nas formulações após 8 horas de estudo.

Resultados expressos em: média ± desvio padrão (quintuplicata).

Legenda: PG: controle propilenoglicol contendo ácido rosmarínico; NAR: nanoemulsão contendo ácido rosmarínico; HNAR: hidrogel de hidroxietilcelulose contendo NAR; NARtw: nanoemulsão contendo ácido rosmarínico e polissorbato 80; HNARtw: hidrogel de hidroxietilcelulose contendo NARtw.

Estatística: **a**: significativamente maior que PG, NAR, HNAR e HNARtw; **b**: significativamente maior que HNAR.

4. CONCLUSÃO

O presente estudo propôs o desenvolvimento de um sistema nanotecnológico contendo o AR para aplicação tópica. Devido à alta fluidez das nanoemulsões, verificou-se a necessidade de espessar as amostras com hidroxietilcelulose para aumentar a viscosidade e viabilizar o uso na pele. Desse modo, foi evidenciado neste estudo que os hidrogéis mantiveram as características observadas nas nanoemulsões e que os mesmos foram capazes de retardar a liberação do AR, favorecendo uma ação prolongada do ativo. Esse perfil também foi observado no estudo de permeação cutânea em pele suína, a partir dos quais o AR permeou menos a partir dos hidrogéis em comparação com as nanoemulsões. Contudo, ao se comparar os hidrogéis HNAR e HNAR_{tw}, percebeu-se um efeito positivo do uso do polissorbato 80, o qual contribuiu significativamente para a permeação do AR em pele total. Complementarmente, a caracterização físico-química e a análise da estabilidade revelaram que a presença do polissorbato 80 favoreceu a diminuição do tamanho de partícula e do índice de polidispersão. O conjunto dos resultados demonstrou que a incorporação do AR em nanoemulsões e hidrogéis pode ser considerada uma estratégia promissora para facilitar a permeação do ativo na pele o que, juntamente com o Tween 80®, contribui para que a formulação exerça sua ação tópica.

REFERÊNCIAS

1. F. Casanova, B. N. Estevinho, and L. Santos, *Powder Technol.* 297, 44 (2016).
2. N. V Yanishlieva, E. Marinova, and J. Pokorny, *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* 108, 776 (2006).
3. A. M. Vaiserman, O. V. Lushchak, and A. K. Koliada, *Ageing Res. Rev.* 31, 9 (2016).
4. N. E. Chalyk, T. Y. Bandaletova, N. H. Kyle, and I. M. Petyaev, *Ski. Res. Technol.* 23, 212 (2017).
5. J. Yang, L. Zhang, J. Li, L. Chen, Q. Zheng, T. Chen, Z. Chen, T. Fu, and L. Di, *J. Funct. Foods* 19, 63 (2015).
6. M. Huang, C. Ho, Z. Y. Wang, T. Ferraro, Y. Lou, K. Stauber, W. Ma, C. Georgiadis, J. D. Laskin, and A. H. Conney, *Cancer Res.* 54, 701 (1994).
7. M. Petersen and M. S. J. Simmonds, *Phytochemistry* 62, 121 (2003).
8. Y. Konishi and S. Kobayashi, *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 69, 583 (2005).
9. S. K. S. Amoah, L. P. Sandjo, J. M. Kratz, and M. W. Biavatti, *Planta Med.* 82, 388 (2016).
10. R. Bhatt, N. Mishra, and P. K. Bansal, *J. Pharm. Sci. Innov.* 2, 28 (2013).
11. G. Kim, Y. S. Park, Y. Jin, and C. Park, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 99, 2083 (2015).
12. H. H. Medrado, E. Santos, E. Ribeiro, J. M. David, J. P. David, J. F. Araújo, A. E. do Vale, M. C. Bellintani, H. N. Brandão, and P. R. Meira, *J. Braz. Chem. Soc.* 28, 505 (2017).
13. P. M. D. J. Fernando, M. J. Piao, K. A. Kang, Y. S. Ryu, S. R. K. M. Hewage, S. W. Chae, and J. W. Hyun, *Biomol. Ther.* 24, 75 (2016).
14. C. Fernandes, C. Oliveira, S. Benfeito, P. Soares, J. Garrido, and F. Borges, *Curr. Med. Chem.* 21, 4311 (2014).
15. S. M. Yoo and J. R. Kang, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 52, 247 (2009).
16. G. K. Zorzi, E. L. S. Carvalho, G. L. von Poser, and H. F. Teixeira, *Rev. Bras. Farmacogn.* 25, 426 (2015).
17. L. A. Balestrin, J. Bidone, R. C. Bortolin, K. Moresco, J. C. Moreira, and H. F. Teixeira, *J. Photochem. Photobiol. B Biol.* 163, 269 (2016).
18. A. P. C. Silva, B. R. Nunes, M. C. De Oliveira, L. S. Koester, P. Mayorga, V. L. Bassani, and H. F. Teixeira, *Pharmazie* 64, 32 (2009).
19. J. Bidone, D. F. Argenta, J. Kratz, L. F. Pettenuzzo, A. P. Horn, L. S. Koester, V. L. Bassani, C. Maria, O. Simões, and H. F. Teixeira, *Biomed Res. Int.* 2015, 1 (2015).
20. É. Martini, E. Fattal, M. C. de Oliveira, and H. Teixeira, *Int. J. Pharm.* 352, 280 (2008).
21. D. Fasolo, V. L. Bassani, and H. F. Teixeira, *Pharmazie* 64, 726 (2009).
22. S. C. Yang and S. Benita, *Drug Dev. Res.* 50, 476 (2000).
23. G. R. Leonardi, L. R. Gaspar, and P. M. B. G. M. Campos, *Clin. Lab. Ther. Investig.* 77, 563 (2001).
24. S. Bhattacharjee, *J. Control. Release* 235, 337 (2016).
25. N. Sekkat, Y. N. Kalia, and R. H. Guy, *J. Pharm. Sci.* 91, 2376 (2002).
26. A. Stelmakiene, K. Ramanauskiene, and V. Briedis, *Acta Pharm.* 65, 199 (2015).
27. J. Pan, Y. Ji, Z. Du, and J. Zhang, *J. Chromatogr. A* 1465, 190 (2016).
28. N. Akhtar, M. U. Rehman, H. M. S. Khan, F. Rasool, T. Saeed, and G. Murtaza, *Trop. J. Pharm. Res.* 10, 281 (2011).

Anexo 1 – Normas para publicação na revista

Journal of Nanoscience and Nanotechnology

ISSN: 1533-4880 (Print); EISSN: 1533-4899 (Online)
Copyright © 2000-2017 American Scientific Publishers. All Rights Reserved.

Instructions for Authors

Journal for Nanoscience and Nanotechnology (JNN) is an international and multidisciplinary peer-reviewed journal with a wide-ranging coverage, consolidates research activities in nanoscience and nanotechnology into a single, and unique reference source.

JNN provides the means for scientists, researchers, engineers, medical experts and technocrats to publish original full research articles, rapid communications of important new scientific and technological findings, timely state-of-the-art reviews with author's photo and short biography and current research news encompassing the fundamental and applied research in all disciplines of the science, engineering and medicine.

JOURNAL POLICY: It is JNN policy to publish only original and unpublished research work therefore JNN does not wish to receive any papers on research work that has already been reported in parts or contains already published text, data, figures, tables or other illustrations or any copyright materials whatsoever that has been submitted or accepted for publication either in a journal or conference proceedings elsewhere in any form, in print or in electronic media. When submitting a manuscript, authors should make a full statement to the Editors that the research work contained in their manuscript is completely original and unpublished. If redundant or duplicate publication is attempted or occurs authors should expect immediate editorial action to be taken including prompt rejection of the submitted manuscript. Submission of any manuscript that contains redundant or duplicate publication of the same or very similar research work violates the policies of this journal.

It is the sole responsibility of all authors to ensure that all manuscripts are new, original and not published previously in any form any media, shall not infringe upon or violate any kind of copyrights of others and does not contain any plagiarized, fraudulent and improperly attributed materials. Extended and modified versions of previously published abstracts, papers in any conference or journal are not allowed whatsoever.

Corresponding author should provide a clear statement confirming this while submitting manuscript to any ASP journal. Is this manuscript 100% original and unpublished? Has this manuscript been published in parts (figures/text/tables) in any conference proceedings or journal in any media or language or format whatsoever? Is this manuscript free from plagiarism (including self-plagiarism) and copyright infringement?

Authors must follow this "Journal Policy" strictly

PUBLISHING ETHICS: *American Scientific Publishers* strictly follows guidelines set by the [Committee on Publication Ethics \(COPE\)](#), [Code of Conduct](#) and [Best Practice Guidelines](#) for Journal Editors, available at www.publicationethics.org. All Authors, Peer-Reviewers and Editors work together in a great harmony to ensure the highest ethical standards in publishing quality research work in our journals.

ETHICAL COMPLIANCE: Research papers reporting animal or clinical studies should, where appropriate, contain a statement that they have been carried out with animal or human ethics committee approval. All scientific studies should be carried out in accordance with the relevant national and local guidelines. Each author(s) warrants that his or her research institution has fully approved the protocol for all scientific studies involving animals or humans and that all experiments of any kinds were conducted in compliance with ethical and humane principles of research after ethics committee approval.

SUBMISSION OF MANUSCRIPT: Authors are kindly advised to read JNN policy before submitting their manuscript to JNN Editors. Authors are encouraged to submit high quality original research work that has not been published or nor under consideration by other journals or conference proceedings elsewhere. *Authors should submit manuscript electronically either as a PDF or Microsoft Word file to the Editor-in-Chief or one of the Regional Editors or one of the Associate Editors in their demographic regions (Asia, Europe, North America).* Authors are highly encouraged to submit

manuscript electronically as a PDF file (preferred) or MS Word file to save time for the reviewing process.

EDITOR-IN-CHIEF

Hari Singh Nalwa, USA

Email: jnn@aspbs.com

Authors should submit a **list of FIVE (5) potential referees** accompanied with their complete mailing address, telephone, fax and email address, who may be contacted for reviewing the manuscript though refereeing is done by anonymous reviewers selected by the Editor-in-Chief or Editors.

COVER ART: JNN features new cover art time to time. Authors are encouraged to submit high quality color figure/illustration to have their published paper featured.

MANUSCRIPT PROCESSING FEES: Authors should understand that there are many occurring publishing expenses per journal page associated with manuscript processing, editorial, production, typesetting, printing, paper, binding, shipping, web-hosting, and archiving. However authors pay no publication fees as well as the costs of any color figure/illustration in a print edition to American Scientific Publishers whatsoever, therefore, publisher is doing all services to authors free of costs and/or at fractional costs, hence, publisher is not obligated to provide any hard/softcopies of journal issue and/or research article to anyone whatsoever. Authors may download pdf file of their published papers from Ingenta after paying fractional costs. If authors require a hardcopy of the journal issue having their research articles then authors may also purchase hardcopies of the journal issue or subscribe to the journal by contacting the publisher. No free hard/softcopies of journal issue and/or research article are provided. On the other hand, if authors want to support the journal by paying full manuscript processing fees plus all costs of color figures/illustrations/photos in a print edition through their research grants or affiliated institutions, then publisher will provide hardcopy of journal issue or pdf file of his/her research article after receiving a full payment. American Scientific Publishers highly appreciate for author's kind understanding and support.

COLORED GRAPHICAL ABSTRACT: JNN requires COLORED GRAPHIC for the Table of Contents that must be supplied with each accepted article. This 8-10 lines graphical abstract with a colored figure/illustration should be prepared in such a way that it gives the reader an overview of the contents in the article. The graphical abstract should contain the full title of the manuscript and a complete list of all authors. The size of the graphical abstract should be limited to within a space of 8.0 (length) x 2.0 (width) inches.

COMMUNICATIONS: Highest priority will be given to the communications reporting important new scientific and technological findings. Rapid publication is provided for concise and up-to-date reports. These articles should not exceed three-four published pages. No section headings should be used for these short communications.

RESEARCH ARTICLES: Full length papers that report original research work on new ideas in the fields of nanoscience and nanotechnology.

REVIEWS: The state-of-the-art review articles with author's short biography and photo are published. Reviews are limited to a maximum length of 35 journal pages having more than 100 references. It is authors' responsibility to obtain written copyright permissions to reproduce any copyright materials from other sources. Authors are advised to cite proper references in figure/tables captions of all previously published figures/tables/illustrations including their own published work and obtain copyright permissions from appropriate publishers and authors.

TYPING: All manuscripts must be in English, typed double-spaced on one side of the page throughout (including footnotes, references, tables, legends) on 8.5" x 11" or A4 white paper leaving at least 1 inch left hand margin.

INTRODUCTORY MATERIAL: The first page of the manuscript should have a concise title limited to about 15 words and the names of all authors, complete mailing address for correspondence, telephone, fax numbers and email address. Please indicate with an asterisk (*) the author to whom correspondence regarding the manuscript should be directed.

ABSTRACT: All manuscripts must contain an informative 150 to 300 words abstract explaining the essential contents of the work, key ideas and results.

FIGURES: It is very important to supply high quality figures in a form suitable for reproduction. All figures, tables, illustrations, photographs should be prepared in such a way that they could be printed in a single column size with a width of 3 1/4 inches or 8.25 cm. Use 14 ARIAL BOLD font for legends and 12 ARIAL font for numbering/wordings in figures, use the same font for all figures. Only if absolutely necessary should figures/tables/photos occupy double columns. Each figure must be referred to in the text and will be printed in black and white unless otherwise instructed by the authors. Each Figure should be submitted on a separate sheet and marked with the name of the author, title of manuscript and figure number. All formulae and figures should be carefully drafted and never drawn freehand. High quality original figures and glossy prints of all photographs are required. Photocopies of the figures and photographs are not acceptable.

FREE COLOR PRINTING: Color illustrations are most welcome by the journal as they are effective in conveying complex graphs and photographs. Free color printing at the Editor-in-Chief's discretion, will provide an opportunity to publish color figures/illustrations in print at NO COST to the authors.

PHOTOGRAPHS: Half-tone illustrations should be supplied as clear, glossy, unmounted prints. The author's name, title of manuscript and figure number should be written on the back.

TABLES: Each table must be referred to in the text. Each table should be typed double-spaced on a separate sheet and identified sequentially by Arabic numerals corresponding to the order in which they appear in the text. Each table should have a brief explanatory title, which should be labeled unambiguously. The position of each table should be clearly marked in the text.

UNITS: Internationally accepted units of measurement must be used. The units of measurement are used in conjunction with their numerical values; the units should be abbreviated as suggested below. If more commonly used units are adopted, conversion factors should be given at their first occurrence. Greek symbols may be used.

%, °C, nm, μm (not m), mm, cm, cm³, m, h (or hr), min, s (or sec), μg , mg, g (or gm), kg, cal, kcal, in. (or write out inch), ml [write out liter(s)].

The APS style guide can be used as a general reference on matter of units, grammar and formatting.

ABBREVIATIONS: No abbreviations are allowed in the title and abstract and should be defined the first time they are used within the text. The "Journal of Nanoscience and Nanotechnology" should be abbreviated as J. Nanosci. Nanotechnol. for the citation purpose.

REFERENCES: References should be in the proper format on a separate page, numbered in the sequence in which they occur in the text. Cite references numerically as superscripts in the text and list at the end of the manuscript. References should be listed in the following style:

1. H. R. Jones and M. K. Wiles, *J. Phys. Chem.* 78, 8356 (1999)
2. J. M. Cowley, *Diffraction Physics*, Elsevier, Amsterdam (1995)
3. C. E. Krill, R. Harberkorn and R. Birringer, in *Handbook of Nanostructured Materials and Nanotechnology* edited H. S. Nalwa, Academic Press, San Diego (1999), Vol. 2, p.155.
4. J. P. Turner and P. C. Chu, in *Microelectronics*, T. J. Kern, Ed., Materials Research Society, Warrendale, PA (1995), Vol. 143, p.375.

Do not use the phrases "et al." and "ibid." in the reference section. Instead, the names of all authors in a reference must be listed.

ACKNOWLEDGEMENTS: These should be brief and placed at the end of the text before the references.

PROOFS: Page proofs for the correction of printer's errors only will be dispatched to the corresponding author denoted with an asterik (*) unless otherwise requested. Alterations at this stage are not allowed as they are expensive and may have to be charged to the authors. The proofread copy and reprint order form must be returned within 72 hours.

OFFPRINTS: Authors may order offprints of articles with a minimum of 100 from American Scientific Publishers (ASP) prior to publication. An order form accompanying the page proofs will be sent directly to the corresponding author (*). Please return your offprint order form with the page proofs.

ELECTRONIC SUBMISSION: Upon acceptance of the manuscript for publication, authors should submit to the publisher a diskette or CD containing the final version of the manuscript accompanied by a hard

copy printout to improve the accuracy and speed up the typesetting process. The disk or CD should be clearly labeled with the author's name, manuscript title, the date, and the hardware and software package used in preparation. The preferred medium is 3.5-inch diskette or a CD in Windows/MS-DOS or Macintosh having TeX. We are also able to accept line artwork/graphics on disk or CD if you supply us the source files to enables us to modify the artwork as required for the journal format.

WARRANTIES AND COPYRIGHTS: By submitting the manuscript, the authors warrant that the entire work is original and unpublished; it is submitted only to this Journal and all text, data, figures/tables or other illustrations included in the research article are completely original and unpublished, and these have not been previously published or submitted elsewhere in any form or media whatsoever. All authors are responsible for the complete contents of their manuscript. The author(s) warrant that the work contains no unlawful or libelous statements and opinions and liable materials of any kind whatsoever, do not infringe on any copyrights, intellectual property rights, personal rights or rights of any kind of others, and does not contains any plagiarized, fraudulent, improperly attributed materials, instructions, procedures, information or ideas that might cause any harm, damage, injury, losses or costs of any kind to person or property. Each author(s) agrees to defend, indemnify, and hold harmless American Scientific Publishers and the Editors for any breach of such warranties. It is authors' responsibility to obtain written copyright permissions from other sources (publishers) for reproduction of any figures, tables, photos, illustrations, text or other copyright materials from previously published work. It is the policy of American Scientific Publishers to own the copyright of all contributions it publishes. To comply with the U.S. Copyright Law, a Copyright Transfer Form that transfer copyright of the article to the publisher must be completed by the authors prior to publication of an accepted article in this journal. Authors must submit a signed copy of the Copyright Transfer Agreement with their manuscript.

ETHICAL ISSUES: Authors cannot submit a manuscript for publication to other journals simultaneously. It is waste of valuable resources because editors and referees spent a great deal of time processing submitted manuscripts. It is also unethical to republish similar research articles (text/figures/tables) again because journals have limited page space and it most likely violates copyrights which have already been transferred to the first journal. Therefore, all journals require a signed author's copyright transfer agreement stating the originality of the research work submitted through a manuscript. As stated above that authors should submit original, new and unpublished research work to the journal. The ethical issues such as plagiarism, fraudulent and duplicate publication, violation of copyrights, authorship and conflict of interest are serious issues concerning ethical integrity when submitting a manuscript to a journal for publication.

WITHDRAWAL OF MANUSCRIPTS: If the author requests withdrawal of manuscript after submission within the time span when the manuscript is still in the peer-reviewing process with Editors/Referees, author is allowed to withdraw the manuscript without paying any withdrawal penalty whatsoever. However, it is unethical to withdraw a submitted manuscript from one journal if accepted by another journal. The withdrawal of manuscripts from the journals after submitting to the publisher will incur a withdrawal penalty from American Scientific Publishers. After the manuscript is accepted for publication either through journal editors or guest editors or conference organizers, the withdrawal is not permitted by American Scientific Publishers. If the authors or conference organizers or a third party withdraw manuscripts any time after final manuscripts have already been submitted to American Scientific Publishers for processing, the request is not entertained without a significant withdrawal penalty. Authors or conference organizers or a third party are not allowed to withdraw submitted manuscripts because the withdrawal wastes valuable manuscript processing time, money and works invested by the publisher. The authors or conference organizers or a third party must always pay \$200 per page manuscript processing charges as withdrawal penalty to the publisher even if the withdrawal is permitted. The withdrawal of the conference papers by conference organizers will never be permitted and the conference organizers will be punished for withdrawal by paying a withdrawal penalty of US\$500 per manuscript. Withdrawal of manuscripts is only allowed after withdrawal penalty has been fully paid to the American Scientific Publishers by the authors or conference organizers or a third party. Any reason whatsoever of withdrawal of submitted manuscripts is treated as invalid and completely unacceptable under any circumstances. Publisher is not responsible for any damages whatsoever resulting from this consequence of the author's or conference organizer's or a third party decision. All questions or differences whatsoever concerning manuscripts withdrawal from American Scientific Publishers whether as to construction or otherwise, shall be held in the County of Los Angeles, California, United States of America.

ABSTRACTING AND INDEXING: American Scientific Publishers has no control whatsoever over abstracting and indexing of their scientific journals in any types of databases (SCIE, Scopus, Compendex, PubMed, CPCI, etc.), therefore, the publisher does not guarantee and take any responsibilities whatsoever for any kind of abstracting and indexing coverage of the published work in any types of databases whatsoever.

UNAUTHORIZED CONFERENCES: American Scientific Publishers would like to caution potential authors

that there are fraudulent activities going on in some countries where Conference Organizers are cheating fellow colleagues by falsely promising the publication of their research papers in SCIE/EI journals. It is very unfortunate to mention that some conference organizers are using the ASP logo and the journal titles/covers from ASP's websites without any authorization, which is completely illegal. Be aware that such conference organizers also disconnect emails and phones after receiving full payment for registration and publication charges from potential authors. Kindly be vigilant of such illegal activity. American Scientific Publishers is not responsible for such fraudulent activities and for any kind of damages brought on by the author's decisions. Author(s) hereby undertake to indemnify and hold harmless American Scientific Publishers and the Editors for any and all damages/claims/liabilities incurred from any and all actions by the conference organizers or any third party.

WARRANTIES FOR CONFERENCE ORGANIZERS: The Conference Organizer(s) submitting manuscripts to American Scientific Publishers warrant and represent that any material prepared by the Author(s) for the Journal shall be 100% new, original and unpublished in any form, shall not infringe upon or violate any copyright, trademark, obligation of confidentiality or other right or the privacy of others, or contain any libelous or unlawful statements or material or instructions that may cause harm or injury to a person or property; and that he/she will not include in the Journal any Article that the Editor believes or has any reason to believe may infringe or violate such rights or contain such material or matter or instructions that may cause harm or injury.

The Conference Organizer(s) submitting manuscripts to American Scientific Publishers represent and warrant that they have full power and authority to enter into this agreement. The Conference Organizer(s) agree to indemnify and hold the Publisher and any of its representatives harmless from any and all claims, demands, for any special, indirect, incidental, consequential or punitive damages of any kind whatsoever, including, but not limited to all liabilities, lost opportunities, costs, charges and expenses (including counsel fees) that the Publisher incurs or sustains arising out of any breach by the Conference Organizer(s) of the foregoing warranties and representations. The Conference Organizer(s) hereby agrees to indemnify and defend American Scientific Publishers from claims, costs, charges, damages, fees, expenses or liabilities of any kind whatsoever brought or preferred by any third party against Publisher.

The relationship between the parties is that of independent contractors and does not constitute a partnership and the Conference Organizer(s) shall have no authority to bind American Scientific Publishers in any way. All questions or differences whatsoever which may at any time hereafter arise between the parties hereto concerning this Agreement or the subject matter thereof and whether as to construction or otherwise, shall be held in the County of Los Angeles, California. These terms and conditions shall be construed and interpreted under the laws of the State of California.