

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO PAMPA  
CAMPUS URUGUAIANA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**

**IVAN DA SILVA KULMANN**

**“PREPARAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DE  
NANOPARTÍCULAS POLIMÉRICAS CONTENDO METRONIDAZOL E ÓLEO  
DE MELALEUCA CO-ENCAPSULADOS”**

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO**

**Uruguaiiana  
2018**

**IVAN DA SILVA KULMANN**

**“PREPARAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DE  
NANOPARTÍCULAS POLIMÉRICAS CONTENDO METRONIDAZOL E ÓLEO  
DE MELALEUCA CO-ENCAPSULADOS”**

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-graduação *Stricto Sensu* em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Pampa (UNIPAMPA), como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Orientador: Prof. Dr. Eduardo André Bender

Co-orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Simone NoreMBERG Kunz

**Uruguaiana  
2018**

A Comissão Examinadora, abaixo assinada aprova a Dissertação de Mestrado

**“PREPARAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DE  
NANOPARTÍCULAS POLIMÉRICAS CONTENDO METRONIDAZOL E ÓLEO  
DE MELALEUCA CO-ENCAPSULADOS”**

elaborada por

**Ivan da Silva Kulmann**

como requisito parcial para obtenção do grau de

**Mestre em Ciências Farmacêuticas**

**COMISSÃO EXAMINADORA**

---

**Eduardo André Bender, Prof. Dr. (UNIPAMPA)  
(Orientador)**

---

**Letícia Marques Colomé, Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. (UNIPAMPA)**

---

**Rodrigo José Freddo, Prof. Dr. (UNIPAMPA)**

## AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus e aos guias espirituais por suas presenças constantes.

Aos meus pais, Wilson e Maricé; e a tia Iolanda, por estarem sempre ao meu lado me dando apoio, suporte emocional, e acima de tudo, por terem me dado a primeira oportunidade de poder aprender.

Aos meus orientadores, Prof. Eduardo André Bender e Prof<sup>a</sup>. Simone Noremborg Kunz pela belíssima orientação que me foi passada e, acima de tudo, por nunca terem me deixado desistir diante dos obstáculos.

Aos meus amigos, pela força, cumplicidade e por estarem ao meu lado, mesmo que à distância, transformando momentos difíceis em prazerosos sorrisos.

Ao Grupo de Pesquisa em Nanobiotecnologia e Nanotoxicologia, pelo aprendizado e promoção inicial do desenvolvimento deste estudo.

Aos acadêmicos do curso de graduação em Farmácia, Gabriel e Riciele pelo auxílio durante alguns ensaios desta pesquisa.

À Universidade Federal do Pampa (UNIPAMPA), em especial aos campus Itaqui e Uruguaiana, pela infraestrutura e também, por me proporcionar a oportunidade de crescimento pessoal e profissional.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela concessão de bolsa de estudos.

À prof<sup>a</sup>. Letícia Marques Colomé, por sua incansável disponibilidade e auxílio prestativo no aprimoramento deste estudo.

Por fim, à todos que de alguma forma contribuíram para o desenvolvimento deste trabalho, o meu muito obrigado.

## RESUMO

O metronidazol, denominado quimicamente por 1-( $\beta$ -hidroxietil)-2-metil-5-nitroimidazol é um fármaco derivado sintético do 5-nitromidazol, pertencente à classe dos imidazóis, subgrupo dos nitroimidazóis. Confere atividade antiprotozoária, antimicrobiana, sendo clinicamente eficaz na giardíase, tricomoníase e amebíase. Levando em consideração que a terapêutica destas parasitoses possui um tempo de tratamento geralmente longo, nanosistemas carreadores de fármacos tornam-se uma alternativa eficaz de auxiliar no controle de liberação do fármaco, adequar sua especificidade e melhorar a seletividade no local de ação. Dentre os componentes que podem ser utilizados como núcleo oleoso de nanocápsulas, está o óleo de melaleuca (*Melaleuca Alternifolia Cheel*). Este apresenta atividade antibacteriana, antifúngica e antiprotozoária bastante promissora. Desta forma o presente trabalho teve por objetivo estudar, desenvolver e caracterizar nanocápsulas poliméricas contendo metronidazol e óleo de melaleuca coencapsulados, como alternativa moderna ao tratamento de infecções envolvendo giardíase e trichomoníase. As nanocápsulas apresentaram pH ácido, diâmetro de partícula inferior a 300 nm, distribuição granulométrica estreita, potencial zeta negativo (-15,68 a -39,58 mV) e eficiência de encapsulação (EE) superior a 84%. O estudo da liberação *in vitro*, realizado em sacos de diálise, demonstrou que as formulações foram eficientes em controlar a liberação da metronidazol. Assim, estas nanopartículas apresentam-se como sistemas promissores para administração de metronidazol, com potencial para constituir-se em um tratamento eficaz para giardíase e tricomoníase.

**Palavras chave:** Metronidazol, óleo de melaleuca, liberação *in vitro*, nanocápsulas poliméricas, nanotecnologia.

## ABSTRACT

Metronidazole, termed chemically by 1- ( $\beta$ -hydroxyethyl) -2-methyl-5-nitroimidazole is a synthetic derivative of 5-nitroimidazole, belonging to the class of imidazoles, subgroup of nitroimidazoles. It shows antiprotozoal activity, antimicrobial, being clinically effective in giardiasis, trichomoniasis and amebiasis. Taking into consideration that the therapy of these parasites has a generally long treatment time, drug carrier nanosystems have become an effective alternative to assist in drug release control, to tailor its specificity and to improve site selectivity of action. Among the components that can be used as an oily nucleus of nanocapsules is melaleuca oil (*Melaleuca Alternifolia* Cheel), due to its antibacterial, antifungal and antiprotozoal activity, it is promising. In this way the present work had the objective to study, develop and characterize polymeric nanocapsules containing metronidazole and coencapsulated melaleuca oil, as a modern alternative to the treatment of infections involving giardiasis and trichomoniasis. The nanocapsules presented acid pH, particle diameter less than 300 nm, narrow particle size distribution, negative zeta potential (-15.68 to -39.58 mV) and encapsulation efficiency of over 84%. The study of the *in vitro* release, carried out in dialysis bags, demonstrated that the formulations were efficient in controlling the release of metronidazole. Thus, these formulations present themselves as promising systems for administration of metronidazole, with potential to constitute an effective treatment for giardiasis and trichomoniasis.

**Keywords:** Metronidazole, melaleuca oil, *in vitro* release, polymeric nanocapsules, nanotechnology.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

### LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Estrutura química do Metronizazol.....	18
Figura 2 - Representação esquemática de nanocápsulas e nanoesferas poliméricas.....	22
Figura 3 - Determinação da alteração da massa do filme de PCL em contato com o óleo de melaleuca.....	32
Figura 4 - Suspensão de Nanocápsula contendo metronidazol e óleo de melaleuca.....	33
Figura 5 - Distribuição do tamanho de partícula de Nc-Br com base no volume e número de partícula.....	35
Figura 6 - Distribuição do tamanho de partícula de Nc-Met-Mel com base no volume e número de partícula.....	35
Figura 7 - Representação gráfica da curva média de metronidazol obtida por espectrofotometria de absorção no ultravioleta.....	38
Figura 8 - Perfil de liberação do metronidazol livre (MET Livre) e nanoencapsulado (NC MET).....	41

### LISTA DE QUADROS

Quadro - 1 - Espectro de ação do metronidazol.....	19
--	----

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Composição das suspensões de nanocápsulas.....	24
Tabela 2 - Distribuição granulométrica por difração de laser das nanocápsulas. .....	34
Tabela 3 - Valores de pH das suspensões.....	36
Tabela 4 - Valores de potencial zeta e diâmetro médio das suspensões de nanocápsulas.....	37

## LISTA DE ANEXOS

Anexo 1 – Artigo Científico: Nanopartículas poliméricas aplicada a agentes antiparasitários: Uma breve revisão.....	50
Anexo 2 – Normas de publicação na Revista Brasileira de Farmácia.....	76

## LISTA DE ABREVIATURAS

NC: Nanocápsulas;

NE: Nanoesferas;

UV: Ultravioleta;

PCL: Poli ( $\epsilon$ -caprolactona);

MET: Metronidazol

Nc-Br: Nanocápsula branca contendo somente óleo de melaleuca;

Nc-Met-Mel: Nanocápsula contendo metronidazol e óleo de melaleuca;

ANOVA: Análise de variância

EE: Eficiência de encapsulação

LD: Limite de detecção;

LQ: Limite de quantificação;

RSD: Desvio padrão relativo (do inglês: relative standard deviation)

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	13
<b>2. OBJETIVOS</b> .....	15
2.1. Objetivo Geral.....	15
2.2. Objetivos específicos .....	15
<b>3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	16
3.1. Parasitas Intestinais .....	16
3.2. Metronidazol.....	18
3.3. Melaleuca ( <i>Melaleuca alternifolia</i> Cheel.) .....	19
3.4. Óleos Essenciais: importância e atividade biológica .....	21
3.5. Nanopartículas – Sistemas Poliméricos.....	22
<b>4. METODOLOGIA</b> .....	24
<b>4.1. Teste de inchamento de polímero/ dissolução de filmes poliméricos</b> .....	24
<b>4.2. Preparação de nanocápsulas contendo metronidazol</b> .....	24
<b>4.3. Caracterização química e físico-química das formulações de nanocápsulas</b> .....	25
4.3.1. <i>Potencial zeta e tamanho de partícula</i> .....	25
4.3.2. <i>Determinação de pH e aspectos macroscópicos das nanocápsulas</i> .....	26
4.3.3. <i>Doseamento do metronidazol</i> .....	26
4.3.4. <i>Avaliação da taxa de encapsulação de metronidazol nas suspensões coloidais</i> .....	27
4.3.5. <i>Estudo da liberação in vitro</i> .....	28
4.3.6. <i>Ensaio prévios</i> .....	28
4.3.7. <i>Avaliação da liberação in vitro</i> .....	28
<b>4.4. Validação de metodologia analítica por Espectrofotometria de absorção no ultravioleta para a quantificação de suspensões de nanocápsulas contendo metronidazol</b> .....	29
4.4.1. <i>Linearidade</i> .....	29
4.4.2. <i>Limites de Detecção e Quantificação</i> .....	30
4.4.3. <i>Precisão</i> .....	30
4.4.4. <i>Exatidão</i> .....	30

4.5. Análise estatística .....	30
<b>5. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>31</b>
5.1. <i>Teste de inchamento de polímero/ dissolução de filmes poliméricos.....</i>	<i>31</i>
5.2. <i>Caracterização das suspensões de nanocápsulas contendo metronidazol e óleo de melaleuca.....</i>	<i>32</i>
5.3. <i>Determinação do diâmetro de partícula e polidispersão.....</i>	<i>33</i>
5.4. <i>Determinação de pH.....</i>	<i>36</i>
5.5. <i>Determinação do potencial zeta.....</i>	<i>37</i>
5.6. <i>Validação de metodologia analítica por Espectrofotometria de absorção no ultravioleta para a quantificação de suspensões de nanocápsulas contendo metronidazol.....</i>	<i>38</i>
5.6.1. <i>Linearidade.....</i>	<i>38</i>
5.6.2. <i>Limite de detecção e quantificação.....</i>	<i>39</i>
5.6.3. <i>Precisão.....</i>	<i>39</i>
5.6.4. <i>Exatidão.....</i>	<i>39</i>
5.7. <i>Doseamento do metronidazol nas suspensões coloidais e determinação da taxa de encapsulação.....</i>	<i>40</i>
5.8. <i>Liberção in vitro.....</i>	<i>40</i>
<b>6. CONCLUSÕES.....</b>	<b>42</b>
<b>7. REFERÊNCIAS.....</b>	<b>43</b>

## 1. INTRODUÇÃO

Infecções causadas por parasitas intestinais apresentam-se como um grave problema de saúde pública no mundo. Essas infecções tem elevada prevalência em países pouco desenvolvidos no qual as condições sanitárias, de higiene e educação, são precárias. De acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS), as parasitoses configuram um cenário de 2 a 3 milhões de óbitos por ano em todo o mundo, podendo-se citar a ascaridíase, giardíase, amebíase, malária e leishmanias como as parasitoses mais frequentes, sendo as crianças o grupo de risco mais afetado (ESCOBEDO e CIMERMAN, 2007; WHO, 1990).

A giardíase, causada pelo protozoário *Giardia lamblia*, na maioria dos estados do Brasil, apresenta-se prevalente em 20% de escolares e pré-escolares. A contaminação por este parasita ocorre através da contaminação fecal-oral, onde ele passa a se alojar no duodeno ou então em diversos segmentos do intestino. Após estabelecida a relação parasita-hospedeiro, esta parasitose pode ocasionar déficit cognitivo, de crescimento e comprometimento do estado nutricional. Quando em crianças, temos como consequência a má-absorção de açúcares, gorduras, vitaminas A, D, E, K, B12, ácido fólico, ferro e zinco (MELO *et al.*, 2004; FERREIRA *et al.*, 2002).

A terapia medicamentosa envolvendo a giardíase geralmente é feita quando os indivíduos estão em fase sintomática. Dentre as possíveis opções de tratamento estão os nitroimidazólicos, sendo o metronidazol o mais eficaz. O tratamento é realizado durante 5 dias, pela administração do fármaco de 8 em 8 horas, demonstrando percentual de cura de 98% em até 21 dias após o tratamento (FERNANDES, *et al.*, 2012).

O interesse pelo uso de plantas medicinais para tratar patologias cresceu abruptamente nas últimas décadas, embora estas já sejam utilizadas há séculos como curativas. Muitas delas são interessantes do ponto de vista científico por demonstrarem atividades biológicas como analgésica, antifúngica, antimicrobiana, antiprotozoária e anti-inflamatória. Neste sentido, o óleo essencial da melaleuca (*Melaleuca Alternifolia Cheel*), composto por hidrocarbonetos terpênicos, tem sido relatado como um excelente agente

antiprotozoário para o combate da giardíase e tricomoníase. (VIEIRA, BARBOSA e MALTHA, 2004; SIMÕES, 2007).

Levando em consideração que a terapêutica de giardíases e tricomoníases possui um tempo de tratamento geralmente longo, fato este que tem prejudicado a adesão ao tratamento em alguns grupos populacionais, como crianças, novas abordagens terapêuticas se tornam bastante interessantes. Neste sentido, podemos destacar os nanosistemas carreadores de fármacos. Sistemas formados por nanocápsulas podem, por exemplo, carrear fármacos e ainda conter associados ao seu núcleo possíveis óleos com ação farmacológica.

Portanto, sistemas matriciais poliméricos, como as nanocápsulas, poderiam encapsular fármacos como o metronidazol e o óleo de melaleuca e auxiliar no controle de liberação do fármaco, adequar sua especificidade e melhorar a seletividade no local de ação. Além disso, é relatado que sistemas nanoparticulados podem também permitir que seja diminuída a dose utilizada e desta forma evitar ou minimizar o surgimento de efeitos colaterais (MANFROI, STEIN e CASTRO, 2009; SCHAFFAZICK *et al.*, 2003).

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1. Objetivo Geral**

Estudar, desenvolver e caracterizar nanocápsulas poliméricas contendo metronidazol e óleo de melaleuca coencapsulados, como alternativa moderna ao tratamento de infecções envolvendo giardíase e trichomoníase.

### **3.2. Objetivos específicos**

- Elaborar um estudo de revisão bibliográfica sobre o desenvolvimento de nanosistemas poliméricos com aplicação para as doenças parasitárias;
- Preparar, através da técnica de nanoprecipitação, suspensões de nanocápsulas poliméricas, contendo metronidazol, utilizando óleo de melaleuca como núcleo oleoso;
- Caracterizar os parâmetros químicos e físico-químicos das formulações como teor de fármaco, tamanho de partícula, distribuição de tamanho, potencial zeta, pH, eficiência de encapsulação;
- Revalidar um método analítico para a determinação do metronidazol livre e nanoencapsulado por meio da espectrofotometria de absorção no ultravioleta;
- Realizar estudo de liberação *in vitro* do metronidazol a partir das nanocápsulas poliméricas e compará-lo à dissolução do fármaco livre;

### 3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

#### 3.1. Parasitas Intestinais

O conceito de parasitismo é amplo, ele abrange todos os tipos de interações entre a relação parasita-hospedeiro, mas de modo geral pode ser classificado como a relação entre dois organismos sendo que um (parasita) vive no interior ou exterior de um hospedeiro, extraindo deste sua fonte de alimentação e modo de sobrevivência (CIMERMAN e CIMERMAN, 2010).

Os parasitas intestinais incluem um vasto grupo de microorganismos, podendo citar os helmintos e protozoários como os principais responsáveis pela ocorrência de parasitoses. Esses microrganismos dentro do hospedeiro, em pelo menos um dos períodos do ciclo evolutivo, localizam-se no trato gastrointestinal do homem, podendo provocar diversas alterações patológicas (NEVES, 2005).

As parasitoses intestinais são consideradas um grave problema de saúde pública, principalmente em países periféricos onde o desenvolvimento econômico é muito baixo, não havendo condições adequadas de saneamento básico e más condições de higiene. Sua ocorrência pode variar com o clima, condições socioeconômicas, educacionais e sanitárias da região observada, sua prevalência em áreas endêmicas encontra-se em torno de 85%, já nos países em desenvolvimento podem chegar a 90% de prevalência na população, elevando as taxas na medida em que se diminui o nível socioeconômico (ORLANDINI, 2009; CIMERMAN e CIMERMAN, 2010).

De acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS), em 1987 mais de 900 milhões de pessoas no mundo estavam parasitadas pelo *Ascaris lumbricoides*, 900 milhões por *Ancilostomidaeos* e 500 milhões por *Trichuris trichiura*. Estima-se que mais de um bilhão de indivíduos no mundo abrigam pelo menos uma espécie de parasita intestinal, sendo *Ascaris lumbricoides*, *Trichuris trichiura* e *Giardia lamblia* os mais frequentes (WHO, 1990; MACEDO *et al.*, 2005; BRASIL, 2010).

A contaminação por estes parasitas se dá através da ingestão de ovos e cistos presentes na água ou em alimentos, também uma forma de contaminação (e muito comum) é a fecal-oral, através de fezes humanas e/ou animais. As helmintoses com maior ocorrência em humanos são: ascaridiose, tricuriase,

enterobiose, ancilostomose e estrogiloidíase. Já as protozooses destacam-se pela sua maior prevalência e importância na infância, como a Giardíase e Amebíase (SILVA e SANTOS, 2001).

O que preocupa em relação a isso é o fato dessas parasitoses estarem diretamente relacionadas com déficit no desenvolvimento físico, cognitivo e no estado nutricional. Em estudos realizados com crianças em situações higiênico-sanitárias precárias, foi observado relação entre anemia, desnutrição energético-proteica e parasitoses intestinais, ainda as crianças com parasitoses apresentam pior estado nutricional (peso/altura) quando comparadas a crianças sem parasitas (FERREIRA *et al.*, 2002; MOLINA, 1986).

Dentre os agravos nutricionais observados em indivíduos parasitados podemos citar a anemia por deficiência de ferro, obstrução intestinal causada por *Ascaris lumbricoides*, desnutrição energético-proteica naqueles indivíduos diagnosticados com giardíase, além de má absorção intestinal, quadros de diarreia e hipovitaminose A (TSUYUOKA *et al.*, 1999; MUNIZ-JUNQUEIRA E QUEIROZ, 2002; GUPTA E URRUTIA, 1982; TANUMIHARDJ, PERMAESIH E MUHILALM 2004; SANTOS *et al.*, 2005).

Dentre os tratamentos farmacológicos utilizados para a parasitose de maior importância na infância, a giardíase, destaca-se o Tinidazol 50 mg/kg em dose única. Sua recomendação se dá não só por sua maior eficácia >90% quando comparada a outros medicamentos, mas também por apresentar >98% de cura após 7 dias após do tratamento, 86% após 14 dias e 72% após 21 dias da administração. Por ser um medicamento de tomada única, é um fator positivo e favorece a adesão ao tratamento (MENDOZA *et al.*, 2003; PENGSAE *et al.*, 1999).

Uma segunda opção de tratamento é utilizando o fármaco Metronidazol 7,5 mg/kg, sendo administrado de 8 em 8 horas por 5 dias. Esta opção de tratamento demonstrou percentual de cura de 98% 21 dias após o tratamento, ou utilizando suspensão de 25 mg/ml de 8 em 8 horas, por 10 dias, com taxa de cura de 96%, 3 dias após o término do tratamento, porém ainda são relatados efeitos adversos, como gastrointestinais (náusea, vômito), além de distúrbios do sistema imunológico (angiodema), dentre outros (MANFROI, STEIN e CASTRO, 2009).

### 3.2. Metronidazol

O metronidazol, denominado quimicamente por 1-(β-hidroxietil)-2-metil-5-nitroimidazol (Figura 1) é um fármaco derivado sintético do 5-nitroimidazol, pertencente à classe dos imidazóis, subgrupo dos nitroimidazóis. Confere atividade antiprotozoária, antimicrobiana, sendo clinicamente eficaz na giardíase, tricomoníase e amebíase (MENELAOU, 1999; BRUNTON *et al.*, 2006)

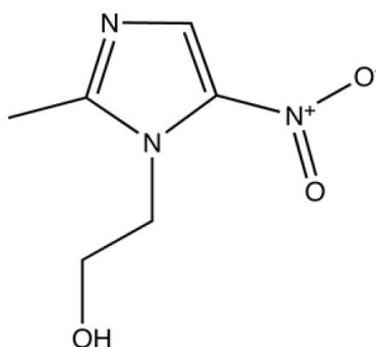


Figura 1 – Estrutura química do metronidazol.

A classe dos imidazóis caracteriza-se pela presença de um núcleo cíclico pentagonal, contendo dois átomos de nitrogênio. O interesse por este grupo químico iniciou-se com a descoberta da azomicina (2-nitroimidazol), que posteriormente isolada de um estreptomiceto demonstrou atividade tricomonocida, gerando diversos ensaios biológicos de compostos nitroimidazólicos (TAVARES, 1999; MAEDA *et al.*, 1953; HORIE, 1956).

O fármaco foi sintetizado pela primeira vez em 1957, dando início aos estudos sobre sua atividade biológica, revelando atividades contra *Trichomonas* spp. Mais tarde, observou-se que o metronidazol não detinha-se somente a essa atividade, e então comprovou-se utilidade clínica importante contra uma variedade de patógenos anaeróbios, incluindo bactérias Gram - e Gram + além de atividade contra *Giardia lamblia* e *Trichomonas vaginalis* (COSAR e JULOU, 1959; HARDMAN *et al.*, 2001).

Quadro 1 – Espectro de ação do metronidazol

Atividade antiprotozoária	<ul style="list-style-type: none"><li>• <i>Balantidium coli</i>;</li><li>• <i>Blastocystis hominis</i>;</li><li>• <i>Chilomastix mesnili</i>;</li><li>• <i>Dracunculus medinensis</i>;</li><li>• <i>Entamoeba histolytica</i>;</li><li>• <i>Giardia lamblia</i>;</li><li>• <i>Trichomonas vaginalis</i>.</li></ul>
---------------------------	--

Fonte: Adaptado de Silva (2002).

É um fármaco relativamente de baixo custo e altamente versátil, podendo ser utilizado isoladamente ou em combinações com outros tratamentos. A absorção máxima ocorre entre 1 à 2 horas, após administração oral, o metronidazol é rapidamente absorvido, no mínimo 80% em menos de 1 hora. O pico sérico obtido após administração oral é semelhante ao obtido após administração de doses equivalentes por via intravenosa. A biodisponibilidade oral é de 100% e não é modificada pela ingestão de alimentos. Este pró-fármaco necessita de ativação pela redução do grupamento nitro, por organismos susceptíveis, essa redução provoca lesões bioquímicas importantes a protozoários e bactérias, como perda da estrutura do DNA, ocasionando a morte celular (MUNOZ, 2015; HARDMAN, LIMBIRD e GILMAN, 2001; LAMP *et al.*, 1999).

### 3.3. Melaleuca (*Melaleuca alternifolia* Cheel.)

A *Melaleuca alternifolia* Cheel. é uma planta utilizada há séculos, devido ao seu potencial medicinal. Vulgarmente conhecida como *Tea Tree Oil*, ou óleo da árvore do chá, a melaleuca é uma árvore aromática que pertence à família *Myrtaceae*. Originária da Austrália, possui grande interesse econômico devido à

presença de óleo volátil armazenado em seus tecidos foliares (SIMÕES, 2007; MONTEIRO *et al.*, 2013).

Essa espécie apresenta-se como uma árvore de pequeno porte (até 5 metros), possui uma fina casca semelhante à espessura de uma folha de papel. Florescendo apenas no verão, suas folhas são afiladas possuindo aproximadamente 2 cm de comprimento. A melaleuca é nativa da costa subtropical nordeste da Austrália, especificamente na região de *New South Wales*, crescendo e desenvolvendo-se em regiões pantanosas ou próximas a rios (LÁSZLÓ, 2007; SILVA *et al.*, 2002).

O termo *Tea Tree Oil* foi denominado no ano de 1777, por James Cook, o capitão observou que a população que habitava a região de *New South Wales* elaborava um chá, a partir de uma árvore pequena, com folhas verdes escuras, até então desconhecida. Além das suas atribuições aromáticas, os nativos da região alegavam que a planta possuía propriedade de cura e crenças sobre lagos (no qual a planta havia sido imersa) também eram muito frequentes na antiguidade (ALTMAN, 1989).

Com o passar dos anos, tais relatos despertaram a curiosidade de pesquisadores que passaram a buscar uma explicação plausível para o efeito curativo da planta. A extração do óleo de suas folhas, por décadas foi realizado pelo corte manual das de suas folhas e acrescido pelo processo de destilação em alambiques. Em 1930 teve-se a primeira publicação em um Jornal de odontologia, no qual MacDonald, um pesquisador, relatava propriedades antissépticas da planta (MACDONALD, 1930).

No final da década de 80, começaram a surgir os primeiros estudos sobre a composição do óleo essencial da melaleuca. Através da cromatografia a gás, os cientistas avaliaram cerca de 800 amostra do óleo e observaram mais de 100 compostos presentes em suas amostras (BROPHY *et al.*, 1989). O óleo da planta é composto basicamente por hidrocarbonetos terpênicos, em principal monoterpênos e sesquiterpênos 1,8-cineol e terpen-4-ol (VIEIRA, BARBOSA e MALTHA, 2004).

### 3.4. Óleos Essenciais: importância e atividade biológica

Óleos essenciais (OE) são misturas complexas de compostos com baixo peso molecular e caracterizam-se por apresentar odores característicos e diferentes colorações. São advindos do metabolismo secundário das plantas em suas mais diversas partes, como folhas, sementes, brotos, raízes e frutas, apresentando-se como uma rica fonte de compostos biologicamente ativos (BURT, 2004).

A composição química dos óleos essenciais pode ser bastante variável, pois fatores ambientais como temperatura, umidade relativa, duração total de exposição ao sol, regimes de ventos e grau de hidratação do solo podem influenciar (SIMÕES, 2007).

Os óleos essenciais são misturas complexas que podem conter de 10 a 60, ou mais, compostos distintos, apresentando-se em diversas concentrações. Devido a essa grande quantidade de compostos neles presentes, diversas atividades biológicas são descritas na literatura científica, tais como: antimicrobianos, antifúngicos, analgésicos, antivirais, entre diversas outras (CARSON, HAMMER e HILEY, 2006; NINOMIYA *et al.*, 2012; GAROZZO *et al.*, 2011).

A atividade biológica dos óleos essenciais não é atribuída em apenas um composto químico, assim como também não é atribuída a apenas um mecanismo de ação, portanto a composição química diversificada permite que vários alvos das células sejam beneficiados. Por possuírem caráter lipofílico, os óleos essenciais atravessam a membrana plasmática das células facilmente, penetram facilmente na mitocôndria dos microrganismos, atuando de forma desestruturante nestas estruturas celulares, o que as tornam mais permeáveis, perdendo íons e outros conteúdos necessários para a sobrevivência celular (DI PASQUA *et al.*, 2006; SIMÕES, 2007).

### 3.5. Nanopartículas – Sistemas Poliméricos

As décadas de 50 e 60 caracterizaram-se por grandes avanços na área da farmacêutica, no qual surgiram modelos para formulações de liberação retardada e controlada de fármacos, com tamanhos menores de partículas. As primeiras nanopartículas surgiram no ano de 1960, para produção de vacinas, após vários testes, em 2005 chegou ao mercado o primeiro produto nanoparticulado, Abraxame® (albumina sérica humana nanoparticulada contendo paclitaxel), desde então novos produtos surgiram utilizando nanosistemas (KREUTER, 2006).

Nanopartículas poliméricas são sistemas carreadores de fármacos, apresentam-se com tamanho de partícula inferior a 1  $\mu\text{m}$  e diferem-se entre si de acordo com sua composição e organização a nível molecular. Esses sistemas são desenvolvidos visando aumentar o controle de liberação do fármaco em questão, a especificidade e a seletividade no local de ação, assim sendo, objetiva-se em diminuir a dose utilizada e os efeitos colaterais (BARRATT, 2000; SCHAFFAZICK *et al.*, 2003).

Dentro da denominação nanopartículas, temos as nanocápsulas (NC) e as nanoesferas (NE) que diferem entre si de acordo com sua estrutura organizacional (Figura 2) (SCHAFFAZICK *et al.*, 2003).

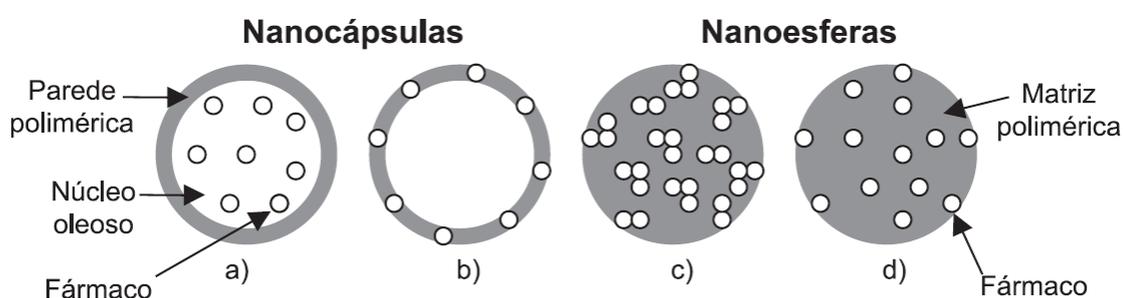


Figura 2 - Representação esquemática de nanocápsulas e nanoesferas poliméricas: a) fármaco dissolvido no núcleo oleoso das NC; b) fármaco adsorvido à parede polimérica das NC; c) fármaco retido na matriz polimérica das NE; d) fármaco adsorvido ou disperso molecularmente na matriz polimérica das NE). Fonte: SCHAFFAZICK *et al.* (2003)

As NE não apresentam óleo em sua composição e são formadas por uma matriz polimérica no qual o fármaco pode ficar adsorvido ou retido, sem a presença de um núcleo. Já as NC caracterizam-se pela presença de uma membrana polimérica disposta ao redor de um núcleo oleoso, fazendo com que o fármaco possa estar dissolvido neste núcleo e/ou adsorvido à parede polimérica. Este nanosistema apresenta elevado potencial de encapsulamento de substâncias, especialmente fármacos com características lipofílicas, além de controlarem a liberação do fármaco em sítios de ação específicos, destacando-se assim de outros nanosistemas (COUVREUR *et al.*, 2002; BARRAT, 2003; SCHAFFAZICK *et al.*, 2003; GUTERRES *et al.*, 2007).

Para a preparação destes nanosistemas, encontra-se vários métodos descritos na literatura, como por exemplo, a técnica de Fessi *et al.*, (1989), que utiliza um polímero pré-formado de disposição interfacial. A partir deste método é possível originar NC de maneira rápida, espontânea, simples e eficiente, apresentando elevada taxa de encapsulação do fármaco (SCHAFFAZICK *et al.*, 2003; GUTERRES *et al.*, 2007).

Esses sistemas têm sido desenvolvidos e utilizados ao longo dos anos visando diversas aplicações terapêuticas, a aplicação desta tecnologia visa aumentar a eficácia de diversos tratamentos, pois permite uma distribuição uniforme e rápida pelo trato gastrointestinal (TGI), reduzir a variação na biodisponibilidade, minimizar os efeitos colaterais, reduzir o número de fármacos usados para o tratamento de uma doença e entre outros benefícios (LIN E KAO, 1991; UHRICH, 1999).

## 4. METODOLOGIA

### 4.1. Teste de inchamento de polímero/ dissolução de filmes poliméricos

Para obtenção do filme polimérico, aproximadamente 150 mg de PCL, foram dispersos em 2mL de acetona. Após a evaporação do solvente, o filme foi dividido em fragmentos pesando cerca de 150 mg. A seguir, o mesmo foi imerso em óleo essencial de melaleuca. Os filmes foram retirados do contato com o óleo, secos com papel toalha e pesados em balança analítica em intervalos de 0, 7 e 16 dias de imersão, a fim de verificar alterações na massa do polímero, decorrentes de sua interação com o óleo (STANGARLIN *et al.*, 2014).

### 4.2. Preparação de nanocápsulas contendo metronidazol

As nanocápsulas foram preparadas conforme metodologia descrita por Fessi *et al.* (1989), incorporando um polímero (nanoprecipitado) pré-formado na composição geral destas, utilizando polímero biodegradável poli-( $\epsilon$ -caprolactona) (PCL). A composição geral das nanopartículas estão descritos na Tabela 1.

Tabela 1. Composição das suspensões de nanocápsulas.

Composição	NC-Met-Mel	Nc-Br
PCL	0,1 g	0,1 g
Óleo de melaleuca	160 mg	160 mg
Tensoativo de baixo EHL monoestearato de sorbitano	0,077 g	0,077 g
Metronidazol	0,01 g	-
Acetona	27 mL	27 mL
Água ultrapura	53 mL	53 mL

Os componentes da fase orgânica foram aquecidos a 37 °C em banho eletrostático para completa dissolução dos constituintes, assim como a fase aquosa foi composta por (polissorbato 80 – *Tween* 80) (0,077 g).

Logo após, a fase orgânica foi vertida, lentamente sob agitação moderada, através de um funil estreito na fase aquosa, para formação das nanocápsulas. A solução foi mantida sob agitação e aquecimento moderados durante 10 minutos. Por fim, a solução foi concentrada a um volume final de 10 mL em evaporador rotatório, para eliminação do solvente orgânico e parte da água, em temperatura ambiente e protegido da luz.

#### **4.3. Caracterização química e físico-química das formulações de nanocápsulas**

As suspensões de nanocápsulas foram caracterizadas quanto aos seguintes parâmetros: diâmetro de partícula, pH, potencial zeta, teor de fármaco e eficiência de encapsulação.

##### *4.3.1. Potencial zeta e tamanho de partícula*

As suspensões aquosas de nanocápsulas foram caracterizadas quanto ao seu diâmetro médio, índice de polidispersão (PDI) e potencial zeta ( $\zeta$ ), por espalhamento dinâmico de luz (DLS) e eletroforese laser Doppler (LDE), medida a 25°C (NanoBrook 90Plus Zeta®, Brookhaven Instruments Corporation, USA).

As amostras foram diluídas previamente com água MilliQ® e 0,01 mol/L de solução aquosa de NaCl. Foram filtrados os meios de diluição (0,45  $\mu$ m) antes da análise, porém cada amostra foi utilizada diretamente, sem filtração ou qualquer outro tratamento, a fins de evitar a seleção das amostras. As medições foram realizadas utilizando-se três diferentes lotes para cada formulação. Os valores médios foram obtidos considerando triplicata de análise para três lotes.

Ainda para avaliar o tamanho da partícula, também foi utilizada a técnica de difratometria de laser, utilizando o equipamento Mastersizer® 2000 (Malvern Instruments) e o acessório Scirocco® 2000. Após obtenção dos dados de

difração de laser, os mesmos foram avaliados utilizando o valor  $d_{4,3}$ , no qual representa o diâmetro médio baseado no volume da partícula e ainda os valores de 10% ( $d_{10\%}$ ), 50% ( $d_{50\%}$ ) e 90% ( $d_{90\%}$ ) da distribuição, que indicam a porcentagem de partículas possuindo diâmetro igual ou inferior ao valor determinado. O valor do SPAN (Equação 1), no qual indica o valor da polidispersão do sistema, também foi utilizado para a caracterização das formulações.

$$SPAN = \frac{(D_{0,9} - D_{0,1})}{D_{0,5}} \quad \text{Eq. (1)}$$

#### 4.3.2. Determinação de pH e aspectos macroscópicos das nanocápsulas

Para realizar a determinação do pH foi utilizado um potenciômetro (Hanna®) calibrado com solução tampão pH 4,0 e 7,0, diretamente nas suspensões coloidais, logo após a preparação. Os resultados representaram a média de três determinações.

As suspensões de nanocápsulas foram avaliadas segundo a aparência macroscópica, levando em consideração a homogeneidade, aspecto leitoso, branco e opalescente. As suspensões apresentaram reflexo azulado, resultante do movimento browniano das nanopartículas em suspensão.

#### 4.3.3. Doseamento do metronidazol

O doseamento de metronidazol foi realizado através de espectrofotometria de absorção no ultravioleta, utilizando um espectrofotômetro da marca Shimadzu modelo UV 1800 (Shimadzu Corporation, Japan), conforme técnica descrita por Lourenço *et al.* (2010) e revalidada conforme descrição abaixo no item 4.4.

A solução padrão estoque de metronidazol foi preparada na pesando-se 10,5 g do fármaco sólido (grau de pureza de 99,9%) e completando-se o volume a 10 mL com solução de ácido clorídrico (HCl) 0,1 M, obtendo-se uma solução de 1,05 mg/mL. As soluções padrão para a confecção da curva de calibração foram obtidas através da diluição correta da solução estoque para obtenção das

concentrações 0,0; 0,5; 5,3; 10,5; 13,1 e 21,0 µg/mL, e posteriormente analisado em espectrofotômetro. As absorvâncias das soluções padrão para construção da curva de calibração e amostra foram lidas em 277 nm, utilizando HCl 0,1 M para ajuste do zero. Foi calculada a quantidade de metronidazol a partir das absorvâncias obtidas das amostras com o uso da equação da curva de calibração. Para o doseamento do metronidazol na nanoformulação contendo óleo de melaleuca foi realizada a extração do fármaco conforme (LOURENÇO *et al.*, 2010). Sucintamente, adicionou-se 100 µL do conteúdo da nanocápsula em balão volumétrico de 10 mL, o volume foi completado com acetonitrila e submetido a agitação em vórtex durante 30 minutos. Posteriormente filtrou-se a solução e a absorvância foi medida.

#### 4.3.4. Avaliação da taxa de encapsulação de metronidazol nas suspensões coloidais

Para a determinação da taxa de encapsulação de metronidazol, alíquotas de 400 µL das formulações foram submetidas à técnica de ultrafiltração-centrifugação, utilizando membrana Microcon 10.000 MW, Millipore® em centrífuga Eppendorf a temperatura ambiente e a 4.500 rpm durante 5 minutos. As alíquotas de ultrafiltrado obtidas foram concentradas e então avaliadas em um espectrofotômetro da marca Shimadzu modelo UV 1800 (Shimadzu Corporation, Japan) para determinação da quantidade de metronidazol livre no meio aquoso da suspensão de nanocápsulas. O percentual de encapsulação (E) foi determinado a partir da razão entre a diferença da concentração total de metronidazol na amostra (CT) e a concentração de metronidazol livre (CL) e a concentração total, multiplicada por 100, como mostra a equação 2.

$$E = \frac{CT - CL}{CT} \times 100$$

Equação 2.

#### 4.3.5. Estudo de liberação *in vitro*

#### 4.3.6. Ensaios prévios

Para que o processo de difusão seja garantido ao longo de todo o ensaio de liberação *in vitro*, o mesmo deve ser realizado sob condições *sink* (ANTONOW, 2012). Desta forma, avaliou-se a solubilidade do metronidazol no meio de dissolução, o qual é composto de polissorbato 20 a 2% e HCl 0.1 M. Sendo assim, uma amostra foi preparada adicionando-se uma quantidade em excesso do fármaco a um volume definido de líquido receptor (1,5 mL). Essa mistura foi submetida a agitação em vórtex durante o tempo de 1 minuto e mantida em repouso por 6 horas. Após esse período, a suspensão foi centrifugada a 12.000 rpm por 5 minutos. Coletou-se uma alíquota do sobrenadante, posteriormente filtrada e a concentração de metronidazol foi determinada por espectrofotometria-UV, representando a concentração de saturação do fármaco no referido meio de dissolução. Esta informação nos permitiu a determinação da condição *sink* a ser utilizada, no qual correspondeu a 10% da concentração de saturação experimentalmente determinada.

Além disso, construiu-se uma curva analítica para avaliar a concentração do metronidazol no meio durante o ensaio de liberação. Para isso, foi preparado o padrão estoque como descrito no item 4.3.3, entretanto o volume foi completado com HCl 0,1 M e polissorbato 20 a 2% (p/v) como solvente.

#### 4.3.7 Avaliação da liberação *in vitro*

O estudo de liberação *in vitro* do metronidazol foi realizado sob condições *sink*, de acordo com a metodologia descrita por Antonow (2012), pelo método de diálise. As formulações de nanocápsulas contendo metronidazol, assim como a substância na forma livre, foram suspensos *Tween* 20 e HCl 0,1 M e adicionados em sacos de diálise (12.000-14.000 Da). As membranas de diálise foram incubadas em 150 mL de meio de liberação constituído de HCl 0.1 M, contendo 2% (p/v) de polissorbato 20 a 37 °C sob agitação contínua. Foram coletadas

alíquotas de 2 mL do meio de liberação, nos intervalos de tempo de 2, 5, 10, 15, 30, 45, 60, 90, 120, 180, 240, 300 e 360 minutos. O meio de liberação foi repostado a cada coleta. A quantidade de metronidazol liberada foi avaliada em espectrofotômetro-UV.

#### **4.4. Validação de metodologia analítica por Espectrofotometria de absorção no ultravioleta para a quantificação de suspensões de nanocápsulas contendo metronidazol**

A partir da Resolução – RE nº 899 de 29 de maio de 2003, que determina o Guia para Validação de Métodos Analíticos e Bioanalíticos, define-se que o processo de validação é essencial para definir se uma metodologia desenvolvida é/está adequada aos objetivos a que se destina, a fim de obter resultados confiáveis que possam ser satisfatoriamente interpretados e reproduzidos. No presente estudo, a metodologia utilizada já havia sido validada anteriormente, deste modo, realizou-se a revalidação da metodologia utilizando alguns parâmetros de acordo com a RE 899 de 29 de maio de 2003 (ANVISA, 2003).

Para a realização das análises, utilizou-se espectrofotômetro da marca Shimadzu modelo UV 1800 (Shimadzu Corporation, Japan) utilizando detector ultravioleta em 277 nm.

##### *4.4.1. Linearidade*

Para o estudo da linearidade, foram utilizados seis pontos da curva de calibração, utilizando as concentrações de 0,0; 0,5; 5,3; 10,5; 13,1 e 21,0 µg/mL, determinados em três dias, construindo-se 3 curvas diferentes. Para cada solução 3 replicatas foram obtidas.

A equação da reta foi obtida através de regressão linear utilizando a curva média de concentração de metronidazol e suas respectivas absorbâncias.

#### 4.4.2. Limites de Detecção e Quantificação

O Limite de Detecção (LD) e o Limite de Quantificação (LQ) foram calculados a partir da equação  $LD = 3.3 \times S_a/b$  e  $LQ = 10 \times S_a/b$ , respectivamente, onde  $S_a$  é o desvio padrão de intercepção e  $b$  indica a inclinação (USP, 2007).

#### 4.4.3. Precisão

A precisão foi expressa pelos coeficientes de variação (expressos como desvio padrão relativo (RSD - do inglês *relative standard deviation*) dos resultados obtidos em triplicata, em três dias diferentes, para três diferentes concentrações do analito, 0,6; 7,0 e 18,0 µg/mL. As soluções foram preparadas pela diluição correta da solução estoque de metronidazol e o volume do balão volumétrico completado com o meio de diluição. O RSD foi calculado a partir da equação:  $S \times 100/x$ , onde  $S$  é o desvio padrão e  $x$  a média.

#### 4.4.4. Exatidão

Para determinar este parâmetro foram preparadas soluções padrão de metronidazol em três diferentes concentrações 0,6; 7,0 e 18,0 µg/mL (baixa, intermediária e alta), analisadas em triplicata. A exatidão foi expressa como a recuperação, em porcentagem, do padrão:  $\text{valor medido a partir de valor medido} \times 100 / \text{valor de referência}$ .

### 4.5 Análise estatística

Os resultados de todos os protocolos experimentais foram analisados estatisticamente mediante a aplicação de análise de variância (ANOVA) com nível de significância de 0,05. Comparações múltiplas foram realizadas pelo método LSD (Least Significance Difference) utilizando software SigmaStat 3.1.

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1. Teste de inchamento de polímero/ dissolução de filmes poliméricos

Para o desenvolvimento de nanocápsulas poliméricas, é essencial que o polímero empregado na constituição da parede da estrutura vesicular seja insolúvel, tanto na água, quanto no óleo formador do núcleo do nanosistema. No entanto é de fundamental importância assegurar que o óleo em que o polímero estará em contato não provocará alterações, como inchamento e dissolução (STANGARLIN *et al.*, 2014)

Filmes de PCL foram colocados imersos em óleo essencial de melaleuca, empregado no preparo das formulações, com intuito de verificar uma possível interação do mesmo com o material utilizado para formação da parede polimérica das nanocápsulas. No início do experimento a massa do filme de PCL em contato com o óleo de melaleuca pesava 130,3 mg, após 29 dias de imersão, o filme de PCL sofreu uma pequena variação, apresentando uma massa de 127,5 mg. A avaliação do peso no início do experimento, e também com 7, 14 e 29 dias de imersão no óleo, demonstrou que o polímero PCL sofreu irrelevante variação de massa que pudesse predizer significativa solubilização ( $p < 0,05$ ) (Figura 3). A diminuta variação observada provavelmente deve-se ao excesso de óleo aderido no filme de polímero no momento da pesagem. Estes resultados encontrados demonstra a adequabilidade da utilização do óleo essencial de melaleuca no desenvolvimento de nanocápsulas, utilizando o polímero PCL para sua obtenção.

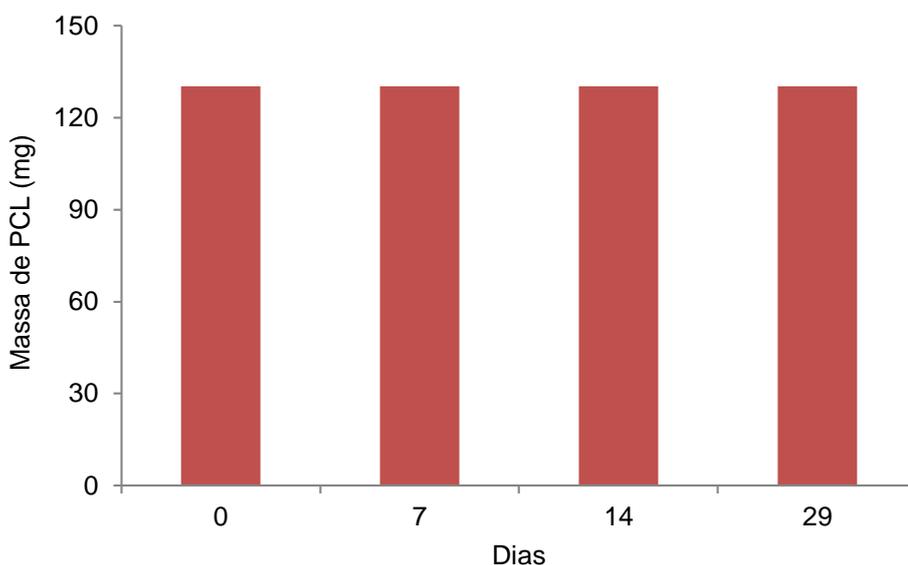


Figura 3. Determinação da alteração da massa do filme de PCL em contato com o óleo de melaleuca.

### 5.2. Caracterização das suspensões de nanocápsulas contendo metronidazol e óleo de melaleuca

Tendo em vista o objetivo de elaborar uma nanoformulação, contendo metronidazol e óleo de melaleuca, adequada, além de assegurar uma liberação controlada do fármaco e elucidar o seu mecanismo de liberação as formulações foram desenvolvidas através do método de deposição interfacial do polímero pré-formado (FESSI *et al.*, 1988), método este que possui como vantagem a formação instantânea, simples, eficiente e de fácil reprodução de nanocápsulas (JIMÉNEZ *et al.*, 2004).

Após a preparação, observou-se que as formulações apresentaram aspecto homogêneo, leitoso e com coloração branco azulada (Figura 3), características peculiares de sistemas coloidais obtidos por nanoprecipitação (SANTOS *et al.*, 2014).

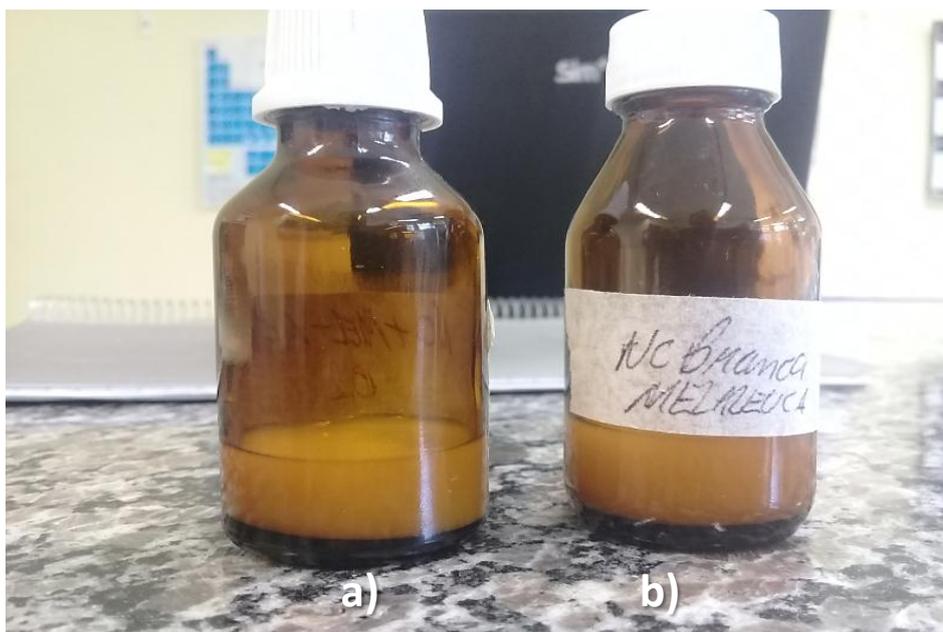


Figura 4 - Suspensão de Nanocápsula contendo metronidazol e óleo de melaleuca (a) e Nanocápsula contendo apenas óleo de melaleuca (b).

### 5.3. Determinação do diâmetro de partícula e polidispersão

De acordo com Schaffazick *et al.* (2003), na determinação do diâmetro da partícula e polidispersão, alguns fatores são importantes, podemos citar a natureza e a quantidade de óleo empregado na preparação, hidrofobicidade, viscosidade e tensão interfacial dos materiais utilizados.

Após o preparo, as suspensões denominadas nanocápsulas brancas (NC-Br), com melaleuca e sem metronidazol, e nanocápsulas de melaleuca e metronidazol (NC-Met-Mel), demonstraram diâmetros médios nanométricos semelhantes (Tabela 2), (Figuras 4 e 5). Os resultados encontrados no presente estudo estão de acordo com o encontrado na literatura, no qual relata que, de um modo geral, as nanopartículas poliméricas apresentam tamanho entre 100 a 300 nm (SCHAFFAZICK *et al.*, 2003).

Tabela 2. Distribuição granulométrica por difração de laser das nanocápsulas.

<b>Amostra</b>	<b>d(0,1) (nm)</b>	<b>d(0,5) (nm)</b>	<b>d(0,9) (nm)</b>	<b>d(4,3) (nm)</b>	<b>SPAN (nm)</b>
<b>Nc-Br</b>	0.079	0.134	0.215	0.142	1.018
<b>Nc-Met-Mel</b>	0.074	0.136	0.245	0.151	1.251

Nc-Br: nanocápsula branca, sem adição de fármaco; Nc-Met-Mel: Nanocápsula contendo metronidazol e óleo de melaleuca.

Em relação à homogeneidade do sistema em sua forma, sugere-se que valores de polidispersão (SPAN) inferiores à 2, indicam que a distribuição de tamanho das partículas encontra-se em uma faixa estreita de diâmetros, já valores elevados sugerem heterogeneidade no diâmetro das nanoformulações (SOUZA *et al.*, 2012; SCHAFFAZICK *et al.*, 2003). As nanopartículas desenvolvidas no presente estudo, apresentaram valores de SPAN inferiores a 2, indicando partículas homogêneas e com distribuição granulométrica estreita do sistema. Ainda, observou-se que para a Nc-Met-Mel o SPAN era maior em comparação à Nc-Br, porém, esta diferença não foi significativa, por ANOVA, pós teste de LSD ( $p < 0,05$ ). Este fato, pode talvez ser atribuído a interação do fármaco com a nanopartícula e conseqüente modificação estrutural. Ao saber, previamente, que o metronidazol é parcialmente solúvel em óleo de melaleuca, parte dele pode estar dissolvido no núcleo oleoso e outra parte aderida ou adsorvida na parede polimérica.

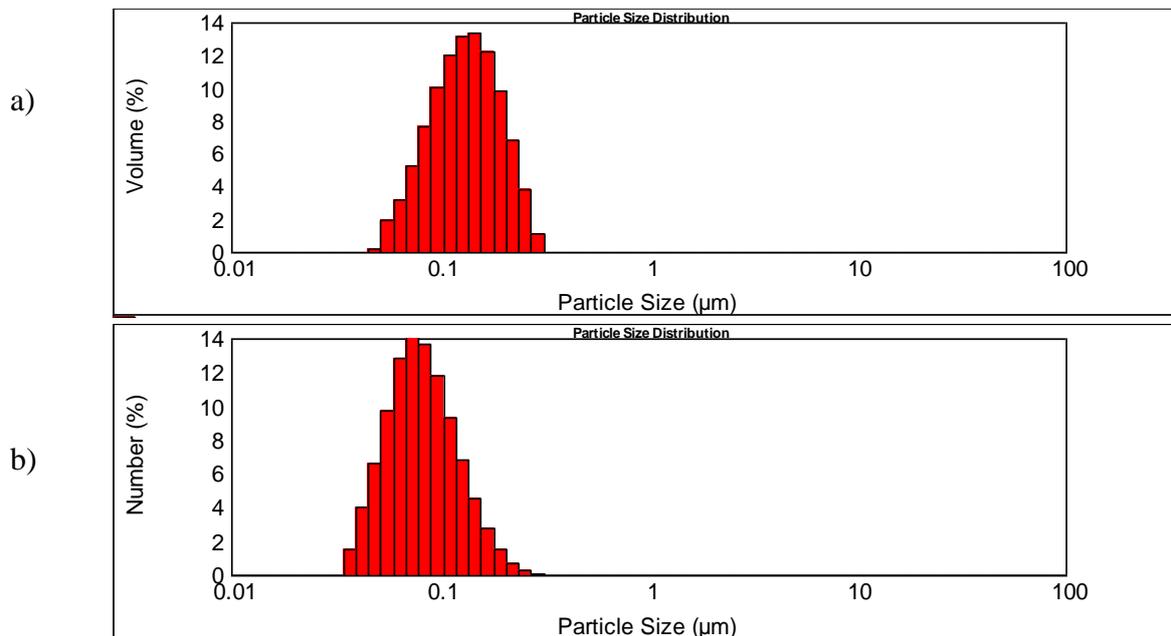


Figura 5 - Distribuição do tamanho de partícula de Nc-Br com base no volume (a) e número (b) de partícula.

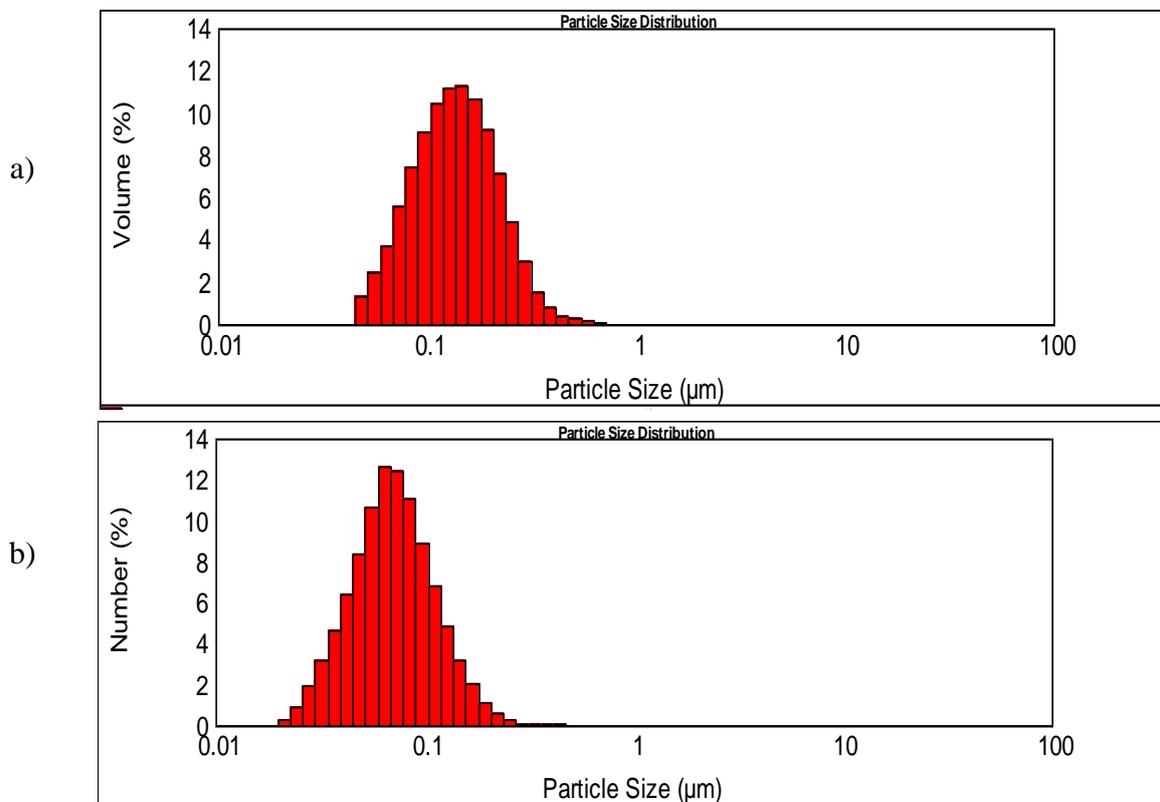


Figura 6 - Distribuição do tamanho de partícula de Nc-Met-Mel com base no volume (a) e número (b) de partícula.

#### 5.4. Determinação de pH

Na estabilidade de sistemas coloidais, temos um parâmetro importante a ser levado em consideração, a medida do pH. Alterações nos seus valores podem estar relacionadas a degradação do polímero ou de algum outro constituinte utilizado na formulação, também pode estar relacionado à difusão do fármaco das nanocápsulas para o meio aquoso (SCHAFFAZICK *et al.*, 2003). No presente estudo, foram verificados valores ácidos, próximos à neutralidade, para todas as suspensões de nanocápsulas. Na tabela 3 pode-se observar a média dos valores obtidos das suspensões contendo de metronidazol associado ao óleo de melaleuca; e suas respectivas formulações controle.

Tabela 3. Valores de pH das suspensões.

<b>Formulações</b>	<b>Medida 1</b>	<b>Medida 2</b>	<b>Medida 3</b>	<b>Média</b>
<b>Nc-Br</b>	5,8	6,1	5,9	5,93±0,122
<b>Nc-Met-Mel</b>	6,5	6,4	6,3	6,4±0,081

Os valores de pH encontrados nas formulações em estudo, preparadas utilizando o PCL como polímero, estão condizentes com o relatado na literatura, para formulações utilizando poliésteres, e preparadas a partir do método de nanoprecipitação. Souza e colaboradores (2017), prepararam nanoformulações de poli( $\epsilon$ -caprolactona) e obtiveram valores médios de pH de 6,16 ( $\pm$  0,16). Em outros estudos, também foi observado valores de pH levemente ácidos foram encontrados por Pissinate e colaboradores (2013), no qual avaliou a atividade antiparasitária de nanocápsulas contendo pirimetamina e PCL como polímero, os valores de pH encontrados ficaram entre 5,42 e 6,86. Ourique e colaboradores (2008) também referiram valores ácidos de pH em nanoformulações contendo tretinoína, e utilizando o mesmo polímero, verificados os valores entre 5,6 e 6,9.

Os valores de pH mais altos foram observados para as suspensões de nanocápsulas contendo metronidazol, quando comparados com as formulações controle. Fato este pode ser justificado pela natureza levemente básica do fármaco, uma vez que em sua estrutura química apresenta um grupamento metil ( $\text{CH}_3$ ) (TAVARES, 1999).

### 5.5. Determinação do potencial zeta

Determinou-se o potencial zeta através de técnicas de eletroforese, que reflete o potencial de superfície das partículas. O valor referente a este potencial é influenciável pelos diversos constituintes das formulações em estudo, especialmente os polímeros, fosfolipídios (lecitinas) e poloxamers (SCHAFFAZICK *et al.*, 2003).

Conforme apresentado na Tabela 4, os valores de potencial zeta encontrados no presente estudo, apresentaram-se negativos, indicando boa estabilidade, ou seja, as partículas apresentam boa repulsão e não aglomeram-se facilmente, garantindo a estabilidade físico-química da suspensão coloidal. Este fato pode ser justificado devido ao polímero utilizado nas formulações apresentar grupamentos éster em sua estrutura química (SCHAFFAZICK *et al.*, 2003).

Tabela 4. Valores de potencial zeta e diâmetro médio das suspensões de nanocápsulas.

<b>Amostra</b>	<b>Média de potencial zeta (mV)</b>	<b>Média de diâmetro médio (nm)</b>
Nc-Br	-15,68±0,082	109,50±0,010
Nc-Met-Mel	-39,58±1,22	221,35±0,112

O potencial zeta observado nas formulações contendo metronidazol e óleo de melaleuca é quase duas vezes maior das formulações controle. Este fato pode ser justificado pela interação do metronidazol com a parede polimérica. Este constituinte pode ter proporcionado o aumento destas cargas negativas superficiais, com isso, podemos afirmar realmente que o fármaco está interagindo (de forma adsorvida ou ligada) à parede polimérica da nanocápsula, fato este, visto pelo aumento do diâmetro médio de partículas quando das análises realizadas pelo NanoBrook 90PLUS ZETA - Brookhaven.

## 5.6. Validação de metodologia analítica por Espectrofotometria de absorção no ultravioleta para a quantificação de suspensões de nanocápsulas contendo metronidazol

### 5.6.1. Linearidade

De acordo com a ANVISA (2013), linearidade é a capacidade do método de demonstrar que os resultados obtidos são diretamente proporcionais à concentração do analito na amostra, dentro de um determinado intervalo.

Obteve-se um coeficiente de determinação de 0,9985, mostrando desta forma a boa linearidade do método conforme demonstrado na Figura 7.

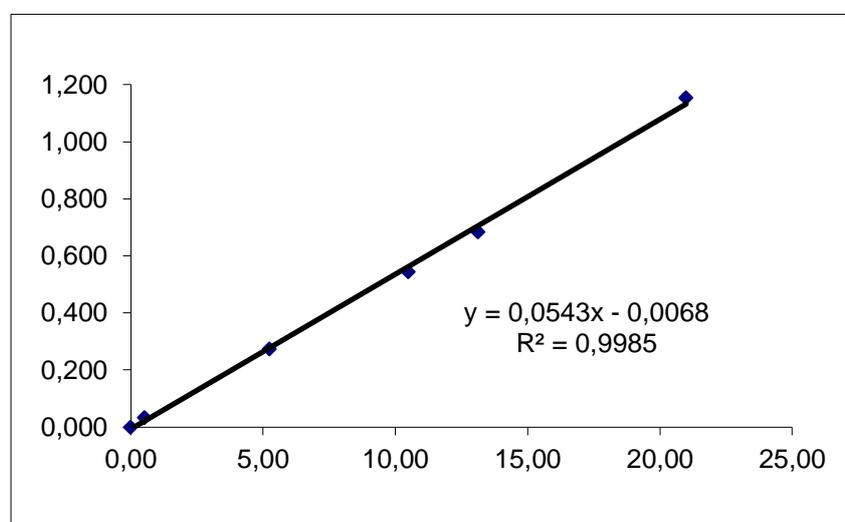


Figura 7. Representação gráfica da curva média de metronidazol obtida por espectrofotometria de absorção no ultravioleta.

### 5.6.2. Limite de detecção e quantificação

Denomina-se por LD a menor quantidade do analito presente em uma amostra que pode ser detectado, porém não necessariamente quantificado, já o LQ a menor quantidade do analito em uma amostra que pode ser determinada

com precisão e exatidão aceitáveis, sob as condições experimentais estabelecidas (ANVISA, 2003).

O valor obtido de LD foi de 0,7 µg/mL e LQ de 2,17 µg/mL, valores abaixo dos determinados nas nanocápsulas, mesmo na primeira coleta do ensaio de dissolução. Portanto, o método pode ser utilizado para a determinação do metronidazol sem prejuízos à quantificação.

### *5.6.3. Precisão*

A precisão é a avaliação da proximidade dos resultados obtidos em uma série de medidas de uma amostragem múltipla de uma mesma amostra. Esta é considerada em três níveis. A partir da avaliação deste parâmetro, obteve-se RSD de 3,26; desta forma o método mostrou-se preciso, uma vez que o valor de RSD determinado foi menor que 5%, valor máximo aceitável preconizado pela ANVISA (ANVISA, 2003).

### *5.6.4. Exatidão*

A exatidão é caracterizada como a proximidade dos resultados obtidos, pelo método em estudo, em relação ao valor verdadeiro (ANVISA, 2003). Obteve-se uma recuperação de 118,12%, 85,85% e 100,32% para as três concentrações, respectivamente. O método apresenta boa exatidão, pois está dentro do preconizado pela ANVISA de 80-120%.

## *5.7. Doseamento do metronidazol nas suspensões coloidais e determinação da taxa de encapsulação*

As formulações Nc-Br e Nc-Met-Mel foram avaliadas quanto ao conteúdo de fármaco, apresentando concentrações experimentais bem próximas à concentração teórica (1,05 mg/mL). Para o doseamento do metronidazol

Inicialmente construiu-se a curva padrão conforme já descrito e os valores de absorvâncias substituídos no y da equação da reta obtida.

Observou-se a média da concentração teórica de 10,72 mg/mL e média do percentual de recuperação de  $105,12 \pm 1,33$  % em relação à quantidade adicionada.

A taxa de encapsulação da metronidazol indica elevado poder de encapsulamento pelas nanocápsulas, visto que o valor encontrado foi superior a 84,50%. Em trabalhos relatados na literatura, a capacidade de encapsulação de compostos lipofílicos em nanocápsulas foi superior ao obtido pelo metronidazol. Neste seguimento pode-se citar como exemplo os valores obtidos para *Lychnopholide*, que variaram entre de 95,4% na formulação utilizando PCL como polímero e 100% para formulação utilizando o polímero PLA-PEG (MELLO *et al.*, 2016). Valores semelhantes também foram encontrados no estudo conduzido por Maha e colaboradores (2015), no qual avaliaram a taxa de encapsulamento de Miltefosina, para tratamento de leishmaniose visceral, obtendo valor superior a 90% de encapsulação.

### 5.8. Liberação *in vitro*

Sistemas coloidais, como as nanocápsulas, controlam a liberação de fármacos em sítios específicos de ação. Estes sistemas otimizam a velocidade de cedência e o regime de dosagem das substâncias. A liberação de fármacos pode ser alteradas por diversos fatores, a partir de sistemas nanocarreadores, como o método de preparação das nanopartículas, a degradação da matriz polimérica, afinidade entre o fármaco e a matriz, cristalinidade do fármaco, natureza do núcleo oleoso das nanocápsulas, condições do ensaio de liberação, entre diversas outras (SANTOS *et al.*, 2012; ANTONOW, 2012; SCHAFFAZICK *et al.*, 2003).

No presente estudo, a liberação *in vitro* de nanocápsulas contendo metronidazol e óleo de melaleuca foi realizada utilizando o método de sacos de diálise. O ensaio demonstrou que as nanoformulações controlaram a liberação da metronidazol em comparação ao fármaco livre. A taxa de liberação do metronidazol a partir da suspensão de nanocápsula foi de 100% em 360

minutos (Figura 8) enquanto que a taxa de dissolução do fármaco livre foi de 100% em 240 minutos. De modo geral, observou-se uma liberação sustentada de metronidazol quando carregado pela nanocápsula, o que demonstra um resultado positivo, visto o objetivo destes nanocarreadores.

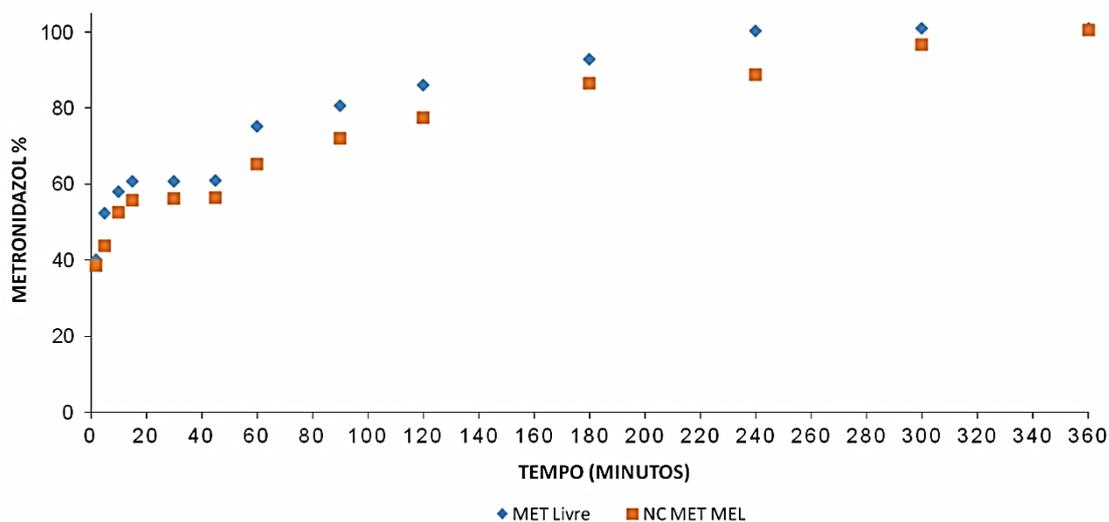


Figura 8 - Perfil de liberação do metronidazol livre (MET Livre) e nanoencapsulado (NC MET).

Ribas e Cruz (2013) verificaram que o cetoprofeno associado à nanopartículas, apresentou um perfil de liberação bifásico, tendo uma rápida liberação inicial e posteriormente uma liberação sustentada. Observou-se que aproximadamente 100% do fármaco foi liberado, das nanocápsulas, em quatro horas de ensaio. Já outro estudo realizado por Santos e colaboradores (2012), contendo nanopartículas lipídicas sólidas contendo dapsona, demonstrou que a difusão da dapsona, a partir das teosferas, ocorreu de maneira sustentada, liberando aproximadamente 52% de fármaco em um período de 12 horas, enquanto o fármaco livre dissolveu mais de 100% no mesmo período.

## 6. CONCLUSÕES

Após análise dos resultados e considerando os objetivos propostos no presente estudo, é possível obter algumas conclusões em relação ao trabalho realizado:

- O desenvolvimento de suspensões de nanocápsulas de metronidazol mostrou-se viável mediante o emprego do óleo essencial de melaleuca;
- As suspensões de nanocápsulas apresentaram diâmetros de partícula nanométricos, distribuição granulométrica estreita, teores totais próximos às concentrações teóricas e elevada eficiência de encapsulação;
- O perfil de liberação *in vitro* obtidos com o método de diálise demonstrou que a nanoformulação proporciona uma liberação semelhante ao fármaco na forma livre, porém, observou-se que a nanocápsula sustenta a liberação do fármaco em estudo.
- A técnica de doseamento do metronidazol por espectrofotometria de absorção no ultravioleta apresentou-se como um método alternativo, rápido, prático, de baixo custo, com menor utilização de solventes orgânicos e conseqüentemente menor geração de resíduos, quando comparados à métodos tradicionais, como por cromatografia líquida de alta eficiência.
- O método revalidado apresentou resultados precisos, lineares, exatos e reprodutíveis; ressaltando mais uma vez seus benefícios.

A partir dos resultados obtidos tem-se como perspectiva futura a continuidade dos experimentos visando realizar estudos de citotoxicidade do óleo essencial de melaleuca objetivando estabelecer a segurança toxicológica do óleo utilizado nas formulações. Também, pretende-se realizar a elaboração de um gel para aplicação tópica, visando atividade antiparasitária de *trichomonas vaginalis*.

## 7. Referências Bibliográficas

ALTMAN, P. M. Australian tea tree oil - a natural antiseptic. **Australian Journal of Biotechnology**, v. 3, n. 4, p. 247-248, 1989.

ANTONOW, M. B. **Desenvolvimento tecnológico e avaliação dos perfis de liberação in vitro de suspensões contendo nanocápsulas de desonida com diferentes polímeros**. Dissertação de Mestrado. Centro Universitário Franciscano. Santa Maria, 2012.

ANVISA, Ministério da Saúde, Brasil. RE 899/2003. "Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos" Resolução - RE nº 899, de 29 de maio de 2003.

APG III. Angiosperm Phylogeny Group. An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: **APG III**. n: 161, p. 105-121, 2009.

BARRAT, G.M. Therapeutic applications of colloidal drug carriers. **Pharma. Sci. Technol. Today, Cambridge**, v.5, p.163-171, 2000.

BERG, O. Myrtaceae. In: MARTIUS, C. F. P; FENZL, E. **Flora brasiliensis: Myrtographiae Brasiliensis Supplementum**. Berlin. v.18, n, 3, 1859. 65 p.

Brasil. Ministério da Saúde. Resolução RE n. 899, de 29 de maio de 2003. Determina a publicação do "Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos". [citado 01 jan. 2018]. Disponível em: <<http://e-legis.anvisa.gov.br/leisref/public/showAct.php?id=15132&word=>>

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. **Doenças infecciosas e parasitárias : guia de bolso**. 8º edição. Brasília : Ministério da Saúde, 2010.

BROPHY, J. J., N. W.; DAVIES, I. A.; SOUTHWELL, I. A.; STIFF, A. N. D.; WILLIAMS, L. R. Gas chromatographic quality control for oil of Melaleuca terpinen-4 ol type (Australian tea tree). **J. Agric. Food Chem.** v. 37, n. 1, p. 1330-1335, 1989.

BRUNTON, L. L.; LAZO, J. S.; PARKER, K. L. **Goodman & Gilman: as bases farmacológicas da terapêutica**. Rio de Janeiro: McGraw-Hill Interamericana do Brasil; 2006. p. 1821.

BURT, S. Essential oils: Their antibacterial properties and potential applications in foods: a review. **International Journal of Food Microbiology**, v. 94, n. 3 p. 223-253, 2004.

CARSON, C. F.; HAMMER, K. A.; HILEY, T. V. *Melaleuca alternifolia* (Tea Tree) Oil: a review of antimicrobial and other medicinal properties. **Rev. Clin. Microbiol.** vol. 19, n. 1, p. 50-62, 2006.

CIMERMAN, B.; CIMERMAN, S. **Parasitologia humana e seus fundamentos gerais**. São Paulo: Editora Athneu, 2010.

COSAR, C.; JULOU, L. Activité de l'(hydroxy-2'éthyl)-1 méthyl-2 nitro-5 imidazole (8.823 R. P.) vis-à-vis des infections expérimentales à *Trichomonas vaginalis*. **Ann Inst Pasteur (Paris)**, v. 96, n. 2, p. 238–241, 1959.

COUVREUR, P. ; BARRAT, G. ; FATTAL, E. ; LEGRAND, P. ; VAUTHIER, C. Nanocapsule technology: a review. **Therapeutic Drug Carrier Systems**. v.19, p.99– 134, 2002.

CRONQUIST, A. **An integrated system of classification of flowering plants**. New York: Columbia Univ. Press, 1981. 1262 p.

DI PASQUA, R.; HOSKINS, N.; BETTS, G.; MAURIELLO, G. Changes in membrane fatty acids composition of microbial cells induced by addition of thymol, carvacrol, limonene, cinnamaldehyde, and eugenol in the growing media. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 54, n. 7, p. 2745– 2749, 2006.

ESCOBEDO, A. A.; CIMERMAN, S. Giardiasis: a pharmacotherapy review. **Journal Expert Opinion on Pharmacotherapy**, v. 8, n. 12, 2007.

FERNANDES, S. *et al.* Protocolo de parasitoses intestinais. **Acta Pediatr Port** v. 43, n. 1, p. 35-41, 2012.

FERREIRA, H. S.; ASSUNCAO, M. L.; VASCONCELOS, V. S. *et al.* Saúde de populações marginalizadas: desnutrição, anemia e enteroparasitoses em crianças de uma favela do "Movimento dos Sem Teto", Maceió, Alagoas. **Rev. Bras. Saude Mater. Infant.**, v. 2, n. 2, p. 177-185, 2002.

FESSI, H., PUISIEUX, F., DEVISSAGUET, J.P., AMOURY, N., BENITA, S. Nanocapsules formation by interfacial polymer deposition following solvent displacement. **International Journal of Pharmaceutics**. V. 55, n. 1, p. R1-R4, 1989.

GAROZZO, A.; TIMPANARO, R.; STIVALA, A.; BISIGNANO, G.; CASTRO, A. Activity of *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil on influenza vírus A/PR/8: study on the mechanism of action. **Antiviral. Res.** vol. 89, n.1, p. 83–88, 2011.

GOMES, S. M.; SOMAVILLA, N. S. D. N.; GOMES-BEZERRA, K. M.; MIRANDA, S. C.; DE-CARVALHO, P. S.; GRACIANO-RIBEIRO, D. Anatomia foliar de espécies de *Myrtaceae*: contribuições à taxonomia e filogenia. **Acta Botanica Brasileira**, v. 23, n. 1, 2009.

GUPTA, M. C.; URRUTIA, J. J. Effect of periodic anti-ascaris and anti-giardia treatment on nutritional status of preschool children. **Am J Clin Nutr**, v. 36, n. 1, p. 79-86, 1982.

GUTERRES, S. S.; ALVES, M. P.; POLHMANN, A. R. Polymeric nanoparticles, nanospheres and nanocapsules, for cutaneous applications. **Drugs Target Insights**, 2007.

HARDMAN, J. G.; LIMBIRD, L. E.; GILMAN, A. G. **Goodman & Gilman's: The Pharmacological Basis of Therapeutics**. New York: McGraw-Hill, 2001.

HARDMAN, J. G.; LIMBIRD, L. E.; GILMAN, A. G. **Goodman & Gilman's: The Pharmacological Basis of Therapeutics**. New York: McGraw-Hill, 2001.

HORIE, H. Anti-Trichomonas effects of azomycin. **J. Antibiotic**. v. 9, 1956.

International Conference on Harmonisation (ICH). Commission of the European Communities – Validation of analytical procedures: text and methodology Q2(R1). Geneva: ICH; 1996.

JIMÉNEZ, M.M.; PELLETIER, J.; BOBIN, M.F.; MARTIN, M.C. Influence of encapsulation on the in vitro percutaneous absorption of octyl methoxynamate. **Int. Journ. of Pharm.**, 2004.

JUDD, W.S.; CAMPBELL, C.S.; KELLONGG, E.A.; STEENS P.F.; DONOGUE, M.J. **Sistemática Vegetal: um enfoque filogenético**. Porto Alegre: editora Artmed, 3ª edição. 2009.

KREUTER, J. Nanoparticles - a historical perspective. **International Journal of Pharmaceutics**, 2006.

LAMP, K. C.; FREEMAN, C. D.; KLUTMAN, N. E.; LACY, M. K. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of the metronidazole antimicrobials. **Clinical Pharmacokinetics**, v. 36, n. 5, p. 353-373, 1999.

LANDRUM, L.R.; KAWASAKI, M.L. The genera of Myrtaceae in Brazil: an illustrated synoptic treatment and identifications keys. *Brittonia*. **New York**. v. 49. n. 4, 1997.

LIN, S.; KAO, Y. Tablet Formulation Study of Spray-Dried Sodium Diclofenac Enteric-coated Microcapsules. **Pharmaceutical Research**, v. 8, n. 7, p. 919-924, 1991.

LINNAEUS, C. **Species Plantarum**. Laurentius Salvius, Stockholm. 1753, 1200 p.

LOURENÇO, F.R.; SILVA, A. C. D.; YAMAMOTO, R. N.; PINTO, T. J. A. Validação de método de doseamento e aplicação em estudo de equivalência farmacêutica de solução injetável de metronidazol. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**. v. 31, n. 1, p. 47-51, 2010.

MACDONALD, V. The rationale of treatment. **Aust. J. Dent.** v. 34, n. 1, p. 81-285, 1930.

MACEDO, H.S. Prevalência de Parasitos e Comensais Intestinais em Crianças de Escolas da Rede Pública Municipal de Paracatu (MG). **Revista Brasileira de Análises Clínicas**, v. 37, n. 4, p. 209–213, 2005.

MAEDA, K.; OSATO, T.; UMEZAWA, H. A new antibiotic azomycin. **Journal of Antibiotics**. 1953.

MAHA, M. E.; EL-MOSLEMANY, R. M.; RAMADAN, A. A.; AMER, E. I.; EL-AZZOUNI, M. Z.; EL-KHORDAGUI, L. K. Miltefosine Lipid Nanocapsules for Single Dose Oral Treatment of Schistosomiasis Mansoni: A Preclinical Study. **PLoS One**, v. 10, n. 11, 2015.

MANFROI, A.; STEIN, A. T.; CASTRO, E. D. F. Projeto Diretrizes: **Associação Médica Brasileira e Conselho Federal de Medicina. Abordagem das Parasitoses Intestinais mais Prevalentes na Infância**. 2009.

MARCHIORI, J. N. C.; SOBRAL, M. **Dendrologia das Angiospermas: Myrtales**. Santa Maria: Ed. da UFMS, 1997. 304p.

MELO, M. C. B.; KLEM, V. G. Q.; MOTA, J. A. C.; PENNA, F. J. Parasitoses Intestinais. **Rev Med Minas Gerais**, v. 14, n. 1, p. 3-12, 2004.

MENDOZA, D.; NUÑEZ, F. A.; ESCOBEDO, A. A.; PELAYO, L.; FERNÁNDEZ, M.; TORRES, D. *et al.* Usefulness of 2 coproparasitological methods and their utilization in an anti-giardiasis therapeutic trial. **Rev Cubana Med Trop**, v. 55, n.1, p. 174-178, 2003.

MOLINA, M. C.; GROSS, R.; SCHELL, B., CUELHO LEÃO, M. A.; STRACK, U.; BRUNKEN, B. Nutritional status of children of urban low-income communities, Brazil. **Rev. Saúde Pública**, v. 23, n.1, p.89-97, 1989.

MONELAOU, A.; SOMOGYI, A. A.; BARCLAY, M. L.; BOCHNER, F. Simultaneous quantification of amoxicillin and metronidazole in plasma using high performance liquid chromatography with photodiode array detection. **Journal of Chromatography B**, v. 731, p. 261-266, 1999.

MONTEIRO, M. H. D. A.; MACEDO, H. W.; JUNIOR, A. S.; PAUMGARTTEN, F. J. R. Óleos essenciais terapêuticos obtidos de espécies de *Melaleuca L.* (*Myrtaceae Juss.*). **Revista Fitos**, v. 8, n. 1, 2013.

MUNIZ-JUNQUEIRA, M. I.; QUEIROZ, E. F. O. Relationship between protein-energy malnutrition, vitamin A, and parasitoses in children living in Brasília. **Rev Soc Bras Med Trop**, v. 35, n. 1, p. 133-141, 2002.

NEVES, D. P. **Parasitologia Médica**. Editora Guanabara Koogan: Rio de Janeiro, 11<sup>o</sup> edição. 2005.

NINOMIYA, K.; MARUYAMA, N.; INOUE, S.; ISHIBASHI, H.; TAKIZAWA, T.; OSHIMA, H.; ABE, S. The essential oil of *Melaleuca alternifolia* (Tea Tree Oil) and its main component, terpinen-4-ol protect mice from experimental oral candidiasis. **Biol. Pharm. Bull.** vol. 35, n. 1, p. 861–865, 2012.

MUNOZ, F. M. Treatment and prevention of giardiasis. Waltham (MA): UpToDate; 2015. Disponível em: <<http://www.uptodate.com/contents/treatment-and-prevention-of-giardiasis>>. Acesso em: 09 ABRIL. 2018;

ORLANDINI, M. R.; MATSUMOTO, L. S. **Prevalência De Parasitoses Intestinais Em Escolares**, 2009, Disponível em <<http://www.diaadiaeducacao.pr.gov.br/portals/pde/arquivos/1655-8.pdf>> Acesso em 05/2017.

OURIQUE, A.F.; MELERO, A.; SILVA, C.B.; SCHAEFER, U.F.; POHLMANN, A.R.; GUTERRES, S.S.; LEHR, C-M; KOSTKA, K-H.; BECK, R.C.R. Improved photostability and reduced skin permeation of tretinoin: Development of a semisolid nanomedicine. **Eur. Journ. Pharm. and Biopharm.**, v.79, 2011.

PENGSA, K.; SIRIVICHAYAKUL, C.; POJJAROENANANT, C.; NIMNUAL, S.; WISETSING, P. Albendazole treatment for Giardia intestinalis infections in school children. **Southeast Asian J Trop Med Public Health**, v. 30, n.1, p. 78-83, 1999.

PISSINATE, K.; MARTINS, E. D.; SCHAFFAZICK, S. R. *et al.* Pyrimethamine-loaded lipid-core nanocapsules to improve drug efficacy for the treatment of toxoplasmosis. **Parasitology research**, v. 113, n. 1, 2013.

PILZ, J.; MEINEKE, I.; GLEITER, C. H. Measurement of free and bound malondialdehyde in plasma by high-performance liquid chromatography as the 2,4 dinitrophenylhydrazine derivative. **Journal of Chromatography B**. v. 742, n. 2, p. 315-325, 2000.

SANTOS, G.S.; PEREIRA, G.G.; BENDER, E.A.; COLOMÉ, L.M.; GUTERRES, S.S.; CARVALHO, C.M.; WEISSMULER, G. Desenvolvimento e caracterização de nanopartículas lipídicas destinadas à aplicação tópica de dapsona. **Quím. Nova**, v.35, n.7, 2012.

SANTOS, S.S.; LORENZONI, A.; PEGORARO, N.S.; DENARDI, L.B.; ALVES, S.H.; SCHAFFAZICK, S.R.; CRUZ, L. Formulation and in vitro evaluation of coconut oil-core cationic nanocapsules intended for vaginal delivery of clotrimazole. **Coll. and suf. B: Bioint.**, v.116, 2014

SCHAFFAZICK, S. R.; GUTERRES, S. S.; FREITAS, L. L.; POHLMANN, A. R. Caracterização e estabilidade físico-química de sistemas poliméricos nanoparticulados para administração de fármacos. **Quím. Nova**, v.26, n.5, 2003.

SILVA C.G.; SANTOS H.A. Ocorrência de parasitoses intestinais da área de abrangência do Centro de Saúde Cícero Idelfonso da Regional Oeste da Prefeitura Municipal de Belo Horizonte, Minas Gerais. **Revista de Biologia e Ciências da Terra**, v.1, n.1, 2001.

SILVA, A. T. A. **Síntese de pró-fármacos derivados de metronidazol**. Dissertação de mestrado. Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho. Araraquara, 2002.

SILVA, S. R. S.; DEMUNER, A. J.; BARBOSA, L. C. de A.; CASALI, V. W. D.; NASCIMENTO, E. A.; PINHEIRO, A. L. Efeitos do estresse hídrico sobre características de crescimento e a produção de óleo essencial de *Melaleuca alternifolia* Cheel. **Acta Scientiarum**, v. 24, n. 5, p. 1363-1368, 2002.

SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 5ª ed. Porto Alegre/Florianópolis: Editora da UFRGS, 2007. 1102 p.

SOARES-SILVA, L. H. **A família Myrtaceae - subtribos: Myrciinae e Eugeniinae na Bacia Hidrográfica do Rio Tibagi**, Estado do Paraná, Brasil. Tese de Doutorado. Campinas, Universidade Estadual de Campinas, 2000.

SOUZA, C. F.; BALDISSERA, M. D.; COSSETIN, L. F.; DALLA LANA; DAIANE F.; MONTEIRO, S. G. Effect of treatment with *Achyrocline satureioides* (free essential oil and nanocapsules) and diminazine acetate on haematological and biochemical parameters in *Trypanosoma evansi*. **Microbial Pathogenesis**, v. 105, n. 1, p. 30-36, 2017.

STANGARLIN, M. F. L. et al. **Avaliação da influência do óleo e do polímero sobre as características físico-químicas e estabilidade de sistemas nanoestruturados contendo ubiquinona**. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal da Santa Maria (UFSM), Santa Maria, p. 115, 2014.

TANUMIHARDJO, S. A.; PERMAESIH, D. Vitamin A status and hemoglobin concentrations are improved in Indonesian children with vitamin A and deworming interventions. **Eur. J Clin. Nutr.** v. 58, n. 1, p. 1223-1230, 2004.

TAVARES, W. **Manual de Antibióticos e Quimioterápicos Antiinfeciosos**. 2ª edição. São Paulo: Atheneu, 1999. 199p.

THE UNITED STATES PHARMACOPOEIA (USP) United States Pharmacopeial Convention, Rockville, 2007.

TSUYUOKA, R.; BAILEY, J. W.; GUIMARÃES, A. M. D. N.; GURGEL, R. Q.; CUEVAS, L. E. Anemia and intestinal parasitic infections in primary school students in Aracaju, Sergipe, Brazil. **Cad Saúde Pública**, v.15, n. 1, p. 413-21, 1999.

VIEIRA, V. R.; BARBOSA, L. C. A.; MALTHA, C. R. A. Constituintes químicos de *Melaleuca alternifolia* (MYRTACEAE). **Revista Química Nova**, vol. 27, n. 4, p. 536-539, 2004.

WHO. Informal consultation on intestinal helminth infections. WHO/CDS/IPI/90.1, 1990.

**Anexo 1 - Artigo Científico: Nanopartículas poliméricas aplicada a agentes antiparasitários: Uma breve revisão.**

O presente artigo será submetido para publicação na Revista Brasileira de Farmácia,

**Nanopartículas poliméricas aplicada a agentes antiparasitários: uma breve revisão**

Ivan da Silva Kulmann<sup>1</sup>, Simone NoreMBERG Kunz<sup>2</sup> & Eduardo André Bender<sup>2\*</sup>

<sup>1</sup>Mestrando do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas (PPGCF) da Universidade Federal do Pampa – UNIPAMPA, campus Uruguaiana – RS.

<sup>2</sup>Docentes do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas (PPGCF) Universidade Federal do Pampa – UNIPAMPA, campus Uruguaiana – RS.

\*BR 472 - Km 585, CEP: 97501-970 – Prédio Administrativo, gabinete 18. Tel.: (55) 3911 0200, Uruguaiana – RS; Brasil.

E-mail: [eduardobender@unipampa.edu.br](mailto:eduardobender@unipampa.edu.br).

## RESUMO

O presente estudo teve por objetivo realizar uma revisão bibliográfica sobre o uso das nanopartículas poliméricas aplicadas a agentes antiparasitários, bem como descrever as principais técnicas utilizadas. A revisão da literatura foi realizada por meio de consulta à base de dados PubMed. Realizou-se a busca através da inserção de dos termos “Antiprotozoal Agents” e “Antiparasitic Agents” associados aos termos “Nanocapsules”, “Nanoparticles”, “Nanosystems”, “Nanobiotechnology” e “Nanotechnology”, conforme desfecho de interesse. Foram selecionados artigos em inglês publicados entre 2013 e 2017. Foram excluídos do estudo, artigos que possuíam o mesmo título com ambos descritores, estudos que utilizaram outras nanoformulações, além daqueles que não possuíam descritos os procedimentos de obtenção das nanocápsulas e/ou os resultados das suas propriedades físico-químicas. Foram selecionados 9 artigos que abordaram o tema proposto para serem utilizados nesta revisão. Dentro os artigos selecionados, observou-se que 33.33% relacionavam-se a agentes antiparasitários utilizados contra o parasita *Trypanosoma evansi* e 22.22% investigou a ação de agentes antiparasitários contra *Trypanosoma cruzi*. Foi possível observar que existem poucos relatos científicos, nos últimos cinco anos, relacionando o uso de agentes antiprotozoários incorporados à nanocápsulas, indicando um vasto campo de pesquisa ainda a ser desenvolvido com relação ao uso da nanotecnologia.

**Palavras-chave:** Agentes antiparasitários, Nanocápsulas, Nanotecnologia

## ABSTRACT

The present study aimed to carry out a literature review on the use of polymer nanoparticles applied to antiparasitic agents, as well as to describe the main techniques used. The review of the literature was carried out by consulting the PubMed database. The search was performed by insertion of the terms "Antiprotozoal Agents" and "Antiparasitic Agents" associated with the terms "Nanocapsules", "Nanoparticles", "Nanosystems", "Nanobiotechnology" and "Nanotechnology", according to the outcome of interest. English articles published between 2013 and 2017 were selected. Articles that had the same title with both descriptors, studies that used other nanoformulations were excluded from the study, besides those that did not have described the procedures of obtaining the nanocapsules and / or the results of the its physicochemical properties. We selected 9 articles that addressed the theme proposed for use in this review. Within the selected articles, it was observed that 33.33% were related to antiparasitic agents used against the parasite *Trypanosoma evansi* and 22.22% investigated the action of antiparasitic agents against *Trypanosoma cruzi*. It was possible to observe that there have been few scientific reports in the last five years relating the use of antiprotozoal agents incorporated in the nanocapsules, indicating a vast field of research still to be developed in relation to the use of nanotechnology.

**Keywords:** Antiparasitic agents, Nanocapsules, Nanotechnology.

## INTRODUÇÃO

A nanotecnologia é um campo da ciência extremamente novo, e vem crescendo consideravelmente durante as últimas décadas. Apresenta-se como uma tecnologia promissora e inovadora, por projetar novos materiais com novas funções, e também, proporcionar a aqueles materiais existentes melhorias em suas propriedades<sup>1</sup>. Trata-se de um conjunto de técnicas empregadas na manipulação de materiais em escala manométrica, sendo considerados aqueles que, após sua síntese, apresenta partículas que atinjam diâmetros inferiores a 1  $\mu\text{m}$ , ou seja,  $10^{-9}$  m (SAhoo & Labhasetwar, 2003; Schaffazick *et al.*, 2003).

Sua aplicação se dá em diversas áreas, porém é na indústria farmacêutica, que a tecnologia vem crescendo expansivamente nos últimos anos. Com o passar do tempo, estudos envolvendo a veiculação de fármacos em nanopartículas, como antimicrobianos, antifúngicos, extratos vegetais com propriedades bioativas, antiparasitários entre outros, foram descritos na literatura, apresentando diversos resultados benéficos do ponto de vista científico como entrega direcionada do fármaco, liberação controlada, aumento da solubilidade e biodisponibilidade de drogas pouco solúveis em água, e por apresentarem pequeno tamanho, a permeabilidade dos fármacos no cérebro, tecidos de câncer e outros órgãos tornou-se possível (Ali *et al.*, 2014; Albanese, Tang & Chan, 2012; Sahni, Baboota & Ali, 2011; Amaral *et al.*, 2009; Bhat, Rizvi & Kumar, 2004; Pinto-alphandary, Andremont & Couvreur, 2000).

Um dos alvos de estudos utilizando nanopartículas carreadoras de fármacos são as doenças parasitárias. Porém, são encontrados poucos estudos na literatura abordando especificamente este assunto tão importante para a saúde das pessoas. Pesquisas demonstram que aproximadamente 300 espécies de helmintos e mais de 70 espécies de protozoários já foram relatados em seres humanos, sendo estas as responsáveis pela causa

da morte de aproximadamente duzentas mil pessoas por ano ao redor do mundo. (Edrissian *et al.*, 2016; Bahmani *et al.*, 2014).

Dentre as doenças parasitárias mais comuns, podemos citar a doença de chagas, toxoplasmose, leishmaniose e malária, sendo esta última responsável por afetar mais de dois bilhões de pessoas no mundo. Além disso as parasitoses intestinais, como a giardíase, ascaridíase, tricuriase e amebíase, apresentam elevada prevalência mundial. Estas doenças são consideradas um grave problema de saúde pública, principalmente em países periféricos onde o desenvolvimento econômico é muito baixo, não havendo condições adequadas de saneamento básico e más condições de higiene (Bahmani *et al.*, 2014; Klein, 2013; Visser *et al.*, 2011; Brasil, 2010).

Visto os benefícios que os sistemas matriciais poliméricos vem demonstrando ao longo dos anos e a elevada prevalência de doenças parasitárias no mundo, este estudo teve por objetivo realizar uma revisão da literatura científica sobre o uso das nanopartículas poliméricas aplicadas a agentes antiparasitários, bem como descrever as principais técnicas utilizadas e os resultados obtidos através dos estudos.

## **MATERIAIS E MÉTODOS**

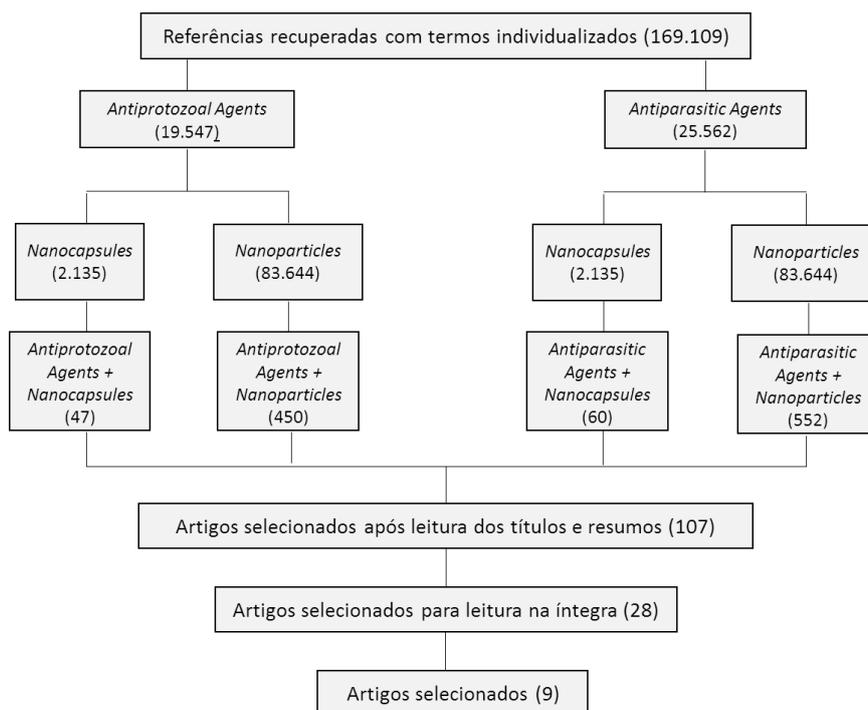
A revisão da literatura foi realizada por meio de consulta à base de dados bibliográfica PubMed. Realizou-se a busca através da inserção de DeCS (Descritores e Ciências da Saúde) e termos livres nas bases de dados. Os termos “*Antiprotozoal Agents*” e “*Antiparasitic Agents*” foram associados aos termos “*Nanocapsules*”, “*Nanoparticles*”, “*Nanosystems*”, “*Nanobiotechnology*” e “*Nanotechnology*”, conforme desfecho de interesse. Foram selecionados artigos em inglês publicados entre 2013 e 2017, que abordaram a elaboração e utilização de formulações de Nanocápsulas aplicadas à agentes antiparasitários, dentre revisões de literatura e ensaios experimentais, que abordaram os tópicos de interesse para esta revisão. Foram excluídos do estudo, artigos que possuíam

o mesmo título com ambos descritores, estudos que utilizaram outras nanoformulações, além daqueles que não possuíam descritos os procedimentos de obtenção das nanocápsulas e/ou os resultados das suas propriedades físico-químicas.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Inicialmente foram identificados 169.109 publicações utilizando os termos de indexação individualizados, ao iniciar a combinação dos termos conforme objetivo do estudo, encontrou-se 107 publicações utilizando os descritores “*Antiprotozoal Agents*” e “*Antiparasitic Agents*” associados aos termos “*Nanocapsules*” e “*Nanoparticles*”. Após aplicar os critérios de inclusão e exclusão, selecionou-se 28 artigos para leitura na íntegra, e por fim, foram selecionados 9 artigos que abordaram o tema proposto (Figura 1).

**Figura 1.** Fluxograma do processo de seleção dos artigos pesquisados. O número de artigos em cada etapa está indicado entre parênteses.



Os dados dos artigos selecionados utilizando nanocápsulas aplicadas agentes antiparasitários estão descritos na Tabela 1. Para fins didáticos esta revisão foi

subdividida em sessões, inicialmente será abordado uma breve revisão bibliográfica sobre nanopartículas poliméricas e processo de sua obtenção, posteriormente suas aplicações em agentes Antiparasitários, como proposto.

**Tabela 1.** Resumo dos achados obtidos de trabalhos que avaliaram o uso de nanopartículas poliméricas e sua incorporação a agentes antiparasitários.

<b>Autor e ano de publicação</b>	<b>Agente Antiparasitário</b>	<b>Parasita</b>	<b>Uso</b>
De Mello <i>et al.</i> , 2016	<i>Lychnophora trichocarpha</i> Spreng (Asteraceae)	<i>Trypanosoma cruzi</i>	Doença de Chagas
Maha <i>et al.</i> , 2015	Miltefosina	<i>Schistosoma mansoni</i>	Esquistossomose
Souza <i>et al.</i> , 2017	<i>Achyrocline satureioides</i>	<i>Trypanosoma evansi</i>	Mal de Cadeiras
Baldisera <i>et al.</i> , 2014	<i>Melaleuca alternifolia</i>	<i>Trypanosoma evansi</i>	Mal de Cadeiras
Gressler <i>et al.</i> , 2015	Curcumina	<i>Trypanosoma evansi</i>	Mal de Cadeiras
Pissinate <i>et al.</i> , 2014	Pirimetamina	<i>Toxoplasma gondii</i>	Toxoplasmose
Penzel <i>et al.</i> , 2015	Albendazol	<i>Echinococcus granulosus</i>	Equinococose cística
Grando <i>et al.</i> , 2016	<i>Melaleuca alternifolia</i>	<i>Haemonchus contortus</i>	Hemoncose
Branquinho <i>et al.</i> , 2014	<i>Lychnophora trichocarpha</i> Spreng (Asteraceae)	<i>Trypanosoma cruzi</i>	Doença de Chagas

- **Nanopartículas: Sistemas poliméricos**

As décadas de 50 e 60 caracterizaram-se por grandes avanços na área da indústria farmacêutica, no qual surgiram modelos para formulações de liberação retardada e controlada de fármacos, com tamanhos menores de partículas. As primeiras nanopartículas surgiram no ano de 1960, para produção de vacinas, após vários testes, em

2005 chegou ao mercado o primeiro produto nanoparticulado, Abraxame® (albumina sérica humana nanoparticulada contendo paclitaxel), desde então novos produtos surgiram utilizando nanosistemas (Kreuter, 2006).

Nanopartículas poliméricas são sistemas carreadores de fármacos, apresentam-se com tamanho de partícula inferior a 1 µm e diferem-se entre si de acordo com sua composição e organização a nível molecular. Esses sistemas são desenvolvidos visando aumentar o controle de liberação do fármaco em questão, a especificidade e a seletividade no local de ação, assim sendo, objetiva-se em diminuir a dose utilizada e os efeitos colaterais (Kreuter, 2006; Schaffazick *et al.*, 2003).

Dentro da denominação nanopartículas, podemos incluir dois tipos: as nanocápsulas (NC) e as nanoesferas (NE) que diferem entre si de acordo com sua estrutura organizacional. As NE não apresentam óleo em sua composição e são formadas por uma matriz polimérica no qual o fármaco pode ficar adsorvido ou retido, sem a presença de um núcleo. Já as NC caracterizam-se pela presença de uma membrana polimérica disposta ao redor de um núcleo oleoso, fazendo com que o fármaco possa estar dissolvido neste núcleo e/ou adsorvido à parede polimérica (Sahni, Baboota & Ali, 2011. Schaffazick *et al.*, 2003).

Dentre os aspectos a serem considerados destes nanosistemas, podemos destacar a melhora nas propriedades físico-químicas das substâncias, controlando a liberação do fármaco em sítios de ação específicos, destacando-se assim, de outros nanosistemas. Conferem ainda, elevado potencial de encapsulamento de substâncias, especialmente fármacos com características lipofílicas; maior estabilidade de substâncias, proporcionando proteção à fatores externos e aumentando sua meia vida, por reduzirem a susceptibilidade à degradação, protegendo-as de fatores do meio, como luz, hidrólise e

oxidação (Vauthier & Bouchemal, 2009; Schaffazick *et al.*, 2003; Couvreur *et al.*, 2002; Barrat, 2000).

Esses sistemas têm sido desenvolvidos e utilizados ao longo dos anos visando diversas aplicações terapêuticas. A aplicação desta tecnologia visa aumentar a eficácia de diversos tratamentos, pois permite uma distribuição uniforme e rápida pelo trato gastrointestinal, reduzir a variação na biodisponibilidade, minimizar os efeitos colaterais, reduzir o número de fármacos usados para o tratamento de uma doença dentre outros benefícios (Kreuter, 2006; Sahoo & Labhasetwar, 2003; Lin & Kao, 1991).

- **Técnicas de preparo de Nanopartículas poliméricas**

Para a preparação destas nanopartículas, encontram-se vários métodos descritos na literatura, porém, podemos classifica-los basicamente em duas formas: por precipitação de polímeros pré-formados, como descrito por Fessi *et al.* (1989). Neste, os autores utilizaram principalmente o poli(ácido lático) (PLA), poli(ácido lático-co-ácido) (PLGA), poli( $\epsilon$ -capro-lactona) (PCL) e também, utilizando copolímeros do ácido metacrílico; ou utilizando métodos que baseiam-se na polimerização *in situ* de monômeros dispersos, como o cianoacrilato de alquila (Vauthier & Bouchemal, 2009; Schaffazick *et al.*, 2003; Fessi *et al.*, 1989).

O procedimento se dá da seguinte forma, haverá sempre uma fase orgânica e uma fase aquosa, a fase orgânica será composta por monômeros ou polímeros pré-formados, solvente, tensoativo, óleo (somente na preparação de nanocápsulas) e o fármaco a ser encapsulado; a fase aquosa será composta por água e tensoativo. Os componentes da fase orgânica são aquecidos a 37 °C em banho eletrostático para completa dissolução dos constituintes. Após este processo, a fase orgânica é vertida lentamente sob agitação moderada, através de um funil estreito na fase aquosa, para formação das nanopartículas poliméricas. Por fim, a solução é concentrada a um volume final desejado em evaporador

rotatório, para eliminação do solvente orgânico e parte da água (Vauthier & Bouchemal, 2009; Schaffazick *et al.*, 2003; Quintanar-guerrero *et al.*, 1989).

A partir deste método é possível originar NC de maneira rápida, simples e eficiente, apresentando de modo geral elevada taxa de encapsulação do fármaco em estudo.

- **Nanocápsulas aplicadas a Agentes Antiparasitários**

Dos nove artigos selecionados, observou-se que 3 (33.33%) abordou a elaboração de nanocápsulas destinadas a avaliar a atividade antiparasitária frente a doença conhecida como Mal das Cadeiras, causada pelo protozoário *Trypanosoma evansi* (*T. evansi*), infectando animais de espécies domésticas selvagens. O tratamento para infecções causadas é realizado através do fármaco Aceturato de diminazeno (AD), normalizando parâmetros hematológicos, porém alguns casos de tratamento com este medicamento foram relatados casos hepatotóxicos e nefrotóxicos. Visto os efeitos adversos do tratamento para *T. evansi*, pesquisadores tem investigado produtos naturais, como óleos essenciais de plantas, como alternativa de tratamento (Souza *et al.*, 2017; Nghoto, *et al.*, 2011; Nunes *et al.*, 1993).

Souza *et al* (2017), em seu estudo, avaliaram o efeito do tratamento com óleo essencial de *A. satureioides* nas formas livres e nanoencapsuladas e AD, em variáveis hematológicas e bioquímicas de ratos infectados por *T. evansi*. As suspensões de nanocápsulas foram preparadas utilizando técnica de precipitação de polímero pré-formado. A nanoformulação foi avaliada quanto às suas propriedades físico-químicas, apresentando tamanho de partícula de 256,7 ( $\pm$  1,27 nm) e índice de polidispersão de 0,097 ( $\pm$  0,007), com um potencial Zeta de -30,4 ( $\pm$  0,18 mV) e pH 6,16 ( $\pm$  0,16).

Ao avaliarem os resultados, observou-se que os animais tratados com óleo essencial mostraram uma média de 20 tripanosomas/campo (1000 $\times$ ), enquanto os animais tratados

com nanocápsulas de óleo essencial apresentaram menor parasitemia (média de 6 tripanossomas/campo - 1000×), no dia 5 pós infecção. O grupo infectado e tratado com AD não apresentou parasitemia.

Em relação aos parâmetros hematológicos, os animais tratados apenas com o óleo essencial, apresentaram redução no número total de eritrócitos e hemoglobina, quando comparados ao grupo controle, já o grupo que recebeu a nanoformulação do óleo, não apresentou alterações nestes parâmetros. De acordo com o protocolo de tratamento utilizado no estudo, o óleo essencial de *A. saturoioides* e o óleo essencial nanoencapsulado não eliminaram completamente os parasitas na circulação sanguínea, o número foi reduzido de formas de tripomastigotas em 33,33% e 80% em 4 dias, respectivamente. Também, foi observado níveis aumentados dos biomarcadores hepáticos ALT e AST, no grupo tratado com óleo essencial de *A. saturoioides* livre. Já na forma nanoencapsulada, não houve alteração nestes parâmetros. Na forma nanoencapsulada, não foi observado aumento desses parâmetros, sendo possível dizer que a forma encapsulada não foi capaz de causar toxicidade hepática. Em conclusão, foi possível observar que o óleo essencial nanoencapsulado teve melhor efeito protetor em ratos infectados com *T. evansi*, do que na forma livre.

Outro estudo também avaliou a ação antiparasitária de um composto natural, desta vez, avaliou-se a ação tripanocida *in vivo* e *in vitro* do óleo essencial da Árvore do chá (TTO) (*Melaleuca alternifolia*) frente *T. evansi* (Baldissera *et al.*, 2014). As nanocápsulas de TTO foram obtidas comercialmente, da empresa Inventiva® (Porto Alegre, Brasil). Resumidamente, foram preparadas nanopartículas lipídicas sólidas com 7,5% de TTO usando um método patenteado (Inventiva®), com base em homogeneização de alta pressão. O palmitato de cetila foi utilizado como lípido sólido e como surfactante, utilizou-se o polisorbato 80. O conteúdo sólido total foi de 18,6%. Para os testes *in vitro*,

as nanocápsulas de TTO foram testadas nas concentrações de 0,125%, 0,5%, 1,0% e 2,0%. Após avaliação dos resultados, observou-se que as nanopartículas apresentaram tamanho de partícula de  $287 (\pm 2 \text{ nm})$  e índice de polidispersão de  $0,203 (\pm 0,022)$ , com um potencial zeta de  $-14,2 \pm 1,7 \text{ mV}$ . Em relação ao efeito tripanocida *in vitro*, as nanocápsulas de TTO apresentaram efeito mais rápido, quando comparadas ao grupo que recebeu o TTO na forma livre, e grupo tratados com AD. Após uma hora de ensaio não houve tripomastigotas vivos na concentração de 2%, e observou-se uma redução de tripomastigotas nas concentrações de 1, 0,5 e 0,125%, além de observar maior longevidade no grupo de tratamento de recebeu nanocápsulas de TTO na dose  $0,9 \text{ mL kg}^{-1}$ . Em conclusão, os autores relatam que o TTO, em suas formas convencionais e nanoestruturadas, apresentam sim atividade tripanocida *in vitro* e *in vivo* contra *T. evansi*, e também leva a maior longevidade animal, porém não foi eficaz no tratamento de camundongos infectados experimentalmente; apenas apresentou um leve controle do parasitismo no início da infecção. O óleo de TTO quando associado ao fármaco AD obteve sucesso terapêutico, tornando-se um método alternativo para tratar e controlar infecções causadas por *T. evansi*.

Ainda na busca de outras alternativas e compostos naturais que apresentem atividade tripanocida, Gressler *et al.* (2015) avaliou a atividade tripanocida *in vitro* e *in vivo* de curcumina livre (CURL) e nanoencapsulada (CRCNC) contra *T. evansi* (Gressler *et al.*, 2015). Ambas as formas da curcumina foram testadas para avaliar a atividade letal contra o parasita. Para realizar os testes *in vivo*, os animais infectados por *T. evansi* foram tratados com CURCL ( $10$  e  $100 \text{ mg/kg}^{-1}$ ) e CRCNC ( $10 \text{ mg/kg}^{-1}$ ) intraperitonealmente, durante 6 dias. Após avaliação dos resultados, observou-se que estes tratamentos atenuaram significativamente a parasitemia. Os ratos infectados do grupo não tratado mostraram peroxidação proteica e um aumento de nitritos/nitratos, enquanto animais

tratados com curcumina apresentaram redução nessas variáveis. Os animais infectados e tratados com CURL exibiram uma redução nos níveis de alanina aminotransferase e creatinina, quando comparados com o grupo de controle positivo. Em conclusão, o uso de curcumina *in vitro* resultou em um melhor controle de parasitemia, atividade antioxidante e um efeito protetor nas funções hepática e renal de ratos *Wistar* infectados com *T. evansi*.

Outro achado na literatura foi um modelo nanoencapsulado buscando atividade antiparasitária frente a Doença de Chagas (DC), causada pelo protozoário *Trypanosoma cruzi* (*T. cruzi*) (Chagas, 1909) Esta doença tropical negligenciada evolui para formas clínicas severas, incapacitando o paciente e ocasionando óbito súbito por cardiopatia (BRASIL, 2010). A transmissão do protozoário ocorre através de vetores Triatomíneos hematófagos, conhecidos como Barbeiro, presentes na região endêmica do sul dos Estados Unidos, da Argentina e Brasil. De acordo com um boletim publicado em 2015 pela *World Health Organization (WHO)*, estima-se que aproximadamente 7 milhões de indivíduos estejam contaminados com *T. cruzi*, atualmente (Who, 2015).

Apenas dois fármacos são utilizados para tratamento de DC, porém, durante a fase crônica da doença, ocorrem baixas taxas de cura parasitológica e a presença de graves efeitos colaterais. Desta forma, De Mello *et al.* (2016) avaliaram uma nova alternativa para o tratamento da infecção experimental por *T. cruzi*, utilizando o anticorpo *Lychnopholide (LYC)*, extraído e isolado da *Lychnophora trichocarpha* Spreng (Asteraceae). Os pesquisadores objetivaram avaliar a eficácia da administração de LYC por via oral e intravenosa, e também a eficiência da administração da forma livre de LYC frente à forma nanoencapsulada, utilizando dois polímeros. Para a formulação 1, utilizou-se 20 mg de LYC, 80 mg do polímero PCL, 250 µL de Miglyol 810N e 75 mg de Epikuron 170 em 10 mL de acetona. Esta solução foi vertida na fase aquosa, composta por 20 mL

de solução aquosa contendo 75 mg de Poloxamer 188, um copolímero de tribloco não iônico. Já a formulação 2 utilizou o polímero dibloco PLA-PEG (60 mg) misturado com 60 mg de homopolímero de PLA foi, neste caso, na ausência de Poloxamer 188. A técnica empregada foi a de deposição de polímero pré-formado, a mais descrita na preparação de nanoformulações (Rodrigues-coura & De Castro, 2002; De Mello *et al.*, 2002).

As formulações de NC apresentaram elevadas taxas de encapsulação de *LYC*, sendo, 95,4% em na formulação 1 e 100% na formulação 2. Os diâmetros médios de  $190,2 \pm 5,7$  nm e  $106,1 \pm 6,3$  nm, para formulações 1 e 2, respectivamente. As nanoformulações apresentaram-se monodispersas, com índice de polidispersão inferiores a 0,3. Ao longo do estudo, observou-se que a administração oral de da formulação 2 (5 mg/kg/dia), durante a fase aguda, em camundongos infectados com *T. cruzi*, apresentou maior eficácia do que a de todos os outros grupos de tratamento. Também apresentaram reduções significativas de parasitemia comparado aos outros grupos testes. A sobrevivência de animais infectados, tratados com a formulação 2, foi superior aos dos grupos tratados com a formulação 1 e *LYC* livre. Além disso, as taxas de cura apresentaram-se maiores com no grupo tratado com a formulação 2 (62,5%) quando comparado ao grupo que recebeu a formulação 1 como tratamento (57%). Já na fase crônica da doença, um maior percentual de cura, após administração oral, foi obtida com a formulação 2 (55,6%) comparada à 1 (30%). Quanto à administração intravenosa (2 mg/kg/dia), nas mesmas condições de tratamento, para a fase crônica, foram alcançados índices de cura semelhantes entre os tratamentos intravenosos (50% e 33,3%) e orais (55,6% e 30%) para formulação 1 e 2, respectivamente. Em conclusão, os autores retratam o primeiro relatório de cura da doença experimental de Chagas por meio da administração oral de uma substância natural isolada e nanoencapsulada, em ambas as fases de infecção.

Branquinho *et al.* (2014), em seu estudo, também avaliaram a eficácia de LYC *in vivo* durante a fase aguda da infecção em experimental em modelos animais infectados com *T. cruzi*. Semelhante ao estudo anteriormente citado, também foram utilizados dois tipos de polímeros: PCL e PLA-PEG. Para preparação das nanoformulações PCL-NC utilizou-se 0,8% (peso/vol) de PCL dissolvido em solução de acetona contendo 0,4% (peso/vol) Epikuron 170, 2,5% (vol/ vol) de Miglyol 810N e LYC para obter a concentração final de 2 mg/mL. Esta solução orgânica foi vertida para a fase aquosa externa, contendo 0,75% (p/v) de Poloxamer 188 e realizou-se a homogeneização. Todos os solventes foram evaporados sob pressão reduzida para processar uma suspensão coloidal NF (10 mL). As formulações com o polímero PEG (PLA-PEG-NC) foram preparadas com um polímero dibloco PLA-PEG. A fase orgânica foi vertida em uma fase aquosa externa e misturada durante 10 minutos. Os solventes foram eliminados sob pressão reduzida. A taxa de encapsulação das suspensões foram maior que 95% em PCL e 100% para a formulação PLA-PEG-NC. O diâmetro médio de LYC-PCL-NC foi  $182,5 \pm 3,2$  nm e de PLA-PEG-NC foi  $105,3 \pm 2,3$  nm, com índice de polidispersão inferior a 0,3. Observou-se que a formulação PLA-PEG-NC demonstrou maior parasitemia quando comparada à formulação LYX-PCL-NC, e ao grupo tratado com LYC na forma livre e com o fármaco referência. Ainda, foi demonstrada maior taxa de sobrevivência e 100% de cura, em modelos experimentais infectados por *T. cruzi* (Branquinho *et al.*, 2014).

Dentre os achados na literatura, aplicando os critérios utilizados nesta revisão bibliográfica, encontrou-se um estudo realizado em 2014 na Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ) em parceria com a Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), no qual busca avaliar a atividade antiparasitária de nanocápsulas de núcleo lipídico, encapsulando pirimetamina (PYR), um fármaco utilizado para tratamento de toxoplasmose, causada pelo protozoário *Toxoplasma gondii* (*T. gondii*) (Pissinate, *et al.*,

2013). A doença é mundialmente espalhada e associada a muitas áreas médicas, como: pediatria, oftalmologia e infecção, relacionada à pacientes imunocomprometidos, principalmente aqueles com AIDS. Sua forma cerebral é a apresentação clínica mais significativa e comum, e uma das principais causas de morbidade e mortalidade nesses pacientes (BRASIL, 2010; MONTOYA *et al.*, 2004). No estudo, as nanocápsulas de núcleo lipídico foram preparadas pelo método de precipitação de polímero pré-formado, onde a fase orgânica foi composta por 0,10 g de PCL, 0,038 g de monoestearato de sorbitano (MS), 0,160 mL de triglicerídeo caprílico/caprico (CCT) e 27 mL de acetona, já a fase aquosa constitui-se de 0,077 g de polissorbato 80 em 53 mL de água ultrapurificada. A fase orgânica foi vertida lentamente na fase aquosa sob agitação moderada à temperatura ambiente. Após 10 min, o solvente orgânico foi eliminado e o volume final ajustado para 10 mL. As nanocápsulas de núcleo lipídico carregadas com PYR (PYR-LNC) foram preparadas com  $0,5 \text{ mg mL}^{-1}$  da droga. A formulação de controle (LNC) foi preparada sem o medicamento. As distribuições de tamanho de partícula de PYR-LNC e LNC mostraram perfis monomodais com tamanhos de partículas inferiores a  $1 \text{ }\mu\text{m}$ , diâmetros médios de  $273 \pm 17,5 \text{ nm}$  e  $150 \pm 5 \text{ nm}$ , respectivamente. O índice de polidispersão do LNC e PYR-LNC apresentou-se abaixo de 0.11, demonstrando distribuições de tamanho estreito. O valor de pH foi de  $5,42 \pm 0,55$  para LNC e  $6,86 \pm 0,16$  para PYR-LNC. Já os potenciais Zeta das formulações LNC e PYR-LNC foram  $-7,1 \pm 0,9 \text{ mV}$  e  $-10,9 \pm 0,1 \text{ mV}$ , respectivamente. Para avaliar o efeito antiparasitário das PYR-LNC, utilizou-se modelos experimentais de ratos infectados com *T. gondii*. Nestes, administrou-se LNC, PYR-LNC e PYR na forma livre por 10 dias. O tratamento com PYR-LNC mostrou melhores resultados do que o PYR na forma livre, os ratos tratados com  $5 \text{ mg/kg/dia}$  de PYR-LNC tiveram taxa de sobrevivência semelhante ao tratamento com  $7,5 \text{ mg/kg/dia}$  de PYR na forma livre, resultando em uma mediana de sobrevivência

de 14 e 12 dias, respectivamente. Em conclusão os autores relataram a melhor eficiência do fármaco nanoencapsulado frente à sua forma livre, aumentando a taxa de sobrevivência e redução da dose do fármaco a ser utilizado no tratamento de toxoplasmose.

Entre as diversas doenças tropicais negligenciadas a Esquistossomose é uma das doenças causadas por protozoários mais prevalentes no mundo conhecida como “barriga-d’água”, causada pelo protozoário *Schistosoma mansoni* (*S. mansoni*), atinge cerca de 230 milhões de pessoas em todo o mundo (Colley & Secor, 2014). O modo de transmissão ocorre através do depósito de ovos do *S. mansoni* na água (depositado pelo hospedeiro infectado, o homem), posteriormente eclodem, liberando uma larva denominada miracídio, que infecta o caramujo. Cerca de 4 a 6 semanas após, a larva abandona o caramujo, ficando livre nas águas naturais. O contato humano com águas infectadas é a forma que o homem adquire a Esquistossomose. O tratamento para esta doença parasitária é feito através do uso do fármaco Praziquantel (PZQ), porém este medicamento não garante proteção contínua da droga contra o *S. mansoni*, desta forma, novos fármacos para tratamento devem ser investigados (Maha *et al.*, 2015; Brasil, 2010).

O Miltefosina (MFS) é um fármaco de interesse a ser investigado pelo seu elevado espectro farmacológico, sendo atualmente, o primeiro e único medicamento oral para leishmaniose visceral. Desta forma, Maha *et al.* (2015), em seu estudo, tentaram avaliar um tratamento eficaz de *Schistosoma mansoni* através da nanoencapsulação de MFS, administrando a formulação em uma única dose. As nanocápsulas foram preparadas como nanocápsulas lipídicas (LNCS) pelo método de inversão de fases, um método isento de solventes orgânicos. Para preparação utilizou-se solutol, Labrafac®, água (1:1:3) água desionizada e cloreto de sódio (0,44% w/v do volume final), foram pesados e misturados sob agitação magnética. A mistura foi sujeita a três ciclos de aquecimento e arrefecimento

progressivo entre 65 e 85 °C (45 a 65 °C para as formulações LNCS contendo ácido oleico (AO). Um choque irreversível foi induzido com água fria desionizada (0-2 °C) adicionado ao óleo em água (o/w) a uma temperatura de 1 - 3 °C, a partir do início da zona de inversão de fase. Isto foi seguido pela retardar agitação magnética da dispersão LNCS durante 5 minutos. Para as formulações carregadas, foi adicionado MFS (0,7 mM% do volume de dispersão final) imediatamente antes da têmpera. Os aditivos, fosfato de dicetila (DCP), brometo de hexadeciltrimetil amonio (CTAB) e OA foram misturadas com outros ingredientes, no início do processo. Após analisar os resultados, as nanocápsulas sem aditivos apresentaram-se uniforme, com diâmetro médio de 58.7 nm, já as formulações com AO e CTAB apresentaram tamanho menor de partícula  $40.5 \pm 0.92$  e  $39.08 \pm 1.61$  para nanocápsulas brancas e nanocápsulas contendo o fármaco em estudo, respectivamente. Quanto à taxa de encapsulação, em todas as formulações apresentaram-se acima de 97,5% com uma carga média de droga de 25,6 mg/g. Ao testarem a atividade antiparasitária, em modelos experimentais infectados com Esquistossomose, observou-se que a administração das seis formulações MFS-LNC reduziram significativamente a carga parasitária em diferentes graus, de 42,31 a 88,46%. Enquanto as que apresentam melhor performance, foram as MFS-LNC composta pelo aditivo CTAB (MFS-LNC-CTAB) e os que contêm ácido oleico (MFS-LNC-OA) induziu a maior redução parasitária. Em conclusão, os autores relatam que nanoformulações com MFS apresentaram atividade antiparasitária frente a *S. mansoni*, ainda, as formulações adicionadas de aditivos com atividade de membrana, proporcionaram uma melhora na eficácia do tratamento, podendo o mesmo ser reformulado e o MFS ser redefinido como uma droga contra *S. mansoni*.

Em um estudo realizado em 2015, foram avaliadas a atividade antiprotozoária do fármaco Albendazol (ABZ), em suas formas nanoencapsuladas e na forma livre, contra *Echinococcus granulosus*, uma tênia pertencente à família Taeniidae, causadora da

doença Equinococose cística (CE) (PENZEL *et al.*, 2015; BRASIL, 2010). O tratamento para esta zoonose é realizado com benzimidazóis (BZ), como o albendazol e mebendazol em múltiplas doses, porém aproximadamente um terço dos pacientes tratados com drogas BZ foram curados, 30-50% desenvolvem alguma evidência de uma resposta terapêutica, enquanto entre 20 e 40% dos casos não respondem favoravelmente (Moro & Schantz, 2009). As formulação de nanocápsulas contendo ABZ (ABS-LNB) foram preparados de acordo com um processo de inversão de fases. Procedeu-se da seguinte forma: 5 mg de ABZ foi dissolvido em ácido oleico a 80 °C e misturado com Labrafac® (Gatefosse, França). Logo após, Lipoid S75-3® foi adicionado e a mistura foi aquecida novamente para solubilização. Posteriormente a solução foi arrefecida, o Solutol HS15®, foram adicionados a NaCl e água para posterior homogeneização sob agitação magnética. Três ciclos de aquecimento e arrefecimento progressivos foram utilizados, entre 60 e 90 °C, em seguida, foram realizados a 75 °C durante o último ciclo, um choque irreversível foi induzido por diluição com água fria (12,5 mL, a 2 °C). Logo após, uma agitação magnética lenta foi aplicada à suspensão de ABS-LNB, e a concentração final alcançada foi de 0,28 mg/mL. A administração das partículas para o tratamento envolveu a via oral e subcutânea. Após administradas, Observou-se que a eficácia clínica do tratamento com ABZ-LNB via oral apresentou 91% quando comparada a forma subcutânea (87.6%), em relação a forma livre de ABZ que apresentou apenas 46.9% de eficácia clínica. Em conclusão, os autores sugerem que a exposição dos cistos hidáticos a droga testada são melhoradas após a administração de ABZ-LNB, podendo, desta forma, ser uma alternativa potencial para melhorar o tratamento da equinococose humana.

Dentre os diferentes estudos aqui selecionados que relacionam a aplicação de nanocápsulas a agentes antiparasitários, a maioria explora a aplicação humana destes nanocarreadores. Porém, aplicando os critérios de seleção aqui proposto, encontrou-se

uma pesquisa realizada em 2016 que visa avaliar a atividade antiparasitária frente à *Haemonchus contortus* (*H. contortus*). Este é o parasita responsável pela doença conhecida como hemoncose em animais ruminantes, como ovinos e caprinos. A doença cursa com anemia hemorrágica, uma vez que estes parasitas possuem o hábito de sugar sangue de seus hospedeiros. Neste caso, cada parasita é capaz de remover cerca de 0,05 mL de sangue por ingestão (Acharya, Hildreth & Reese, 2014; Krecek & Waller, 2006). Um dos principais problemas no combate a esta patologia é o possível surgimento de resistência à drogas indicadas para seu tratamento. Desta forma, Grando *et al.* (2016) investigaram a atividade antiparasitária do óleo essencial da *Melaleuca alternifolia* nas formas nanoencapsuladas e livre em modelos experimentais infectados por *H. contortus* (Grando *et al.*, 2016). No mesmo estudo, um outro grupo experimental recebeu o composto químico terpinen-4 ol, principal composto químico dos óleos essenciais com atividade biológica estabelecida. Após as administrações, os autores observaram que os animais tratados com o óleo de melaleuca nanoencapsulado, apresentaram 48.64% de redução da carga parasitária, quando tratados na dose de 0.5 mL/kg, quando comparado à forma livre de óleo (46,36%). Já os animais tratados com Terp-4-ol na dose de 0.5 mL/kg demonstraram 43.18% de redução. Estes resultados demonstraram que as nanocápsulas de óleo de melaleuca são eficazes no tratamento de hemoncose, em ruminantes.

De modo geral, através desta revisão bibliográfica foi possível observar que ainda são incipientes os estudos descritos na literatura que utilizem nanocápsulas e agentes antiparasitários para combate a doenças negligenciáveis. O mesmo ainda pode ser encontrado para outros tipos de carreadores nanotecnológicos como lipossomas, microssomos e nanoesferas.

Seguindo esta linha, Lopes *et al.* (2016), abordou a Leishmaniose, uma doença tropical negligenciada que afeta cerca de 12 milhões de pessoas no mundo. Ela é causada por protozoários do gênero *Leishmania*, tendo várias espécies descritas na literatura (Lopes *et al.*, 2016; Brasil, 2010). As manifestações clínicas da doença são diversas e apresentam-se desde lesões cutâneas até desfigurações graves e infecção sistêmica fatal, evoluindo à óbito em 90% dos casos, quando não tratada. O atual tratamento da Leishmaniose inclui vários medicamentos, porém, estão associados a efeitos colaterais graves, tratamento prolongado, altos custos e possível resistência medicamentosa. Desta forma, Lopes e colaboradores, resolveram avaliar o potencial da trifluralina (TFL), uma fármaco com potencial leishmanicida, no manejo de infecções por *Leishmania infantum* através da síntese de análogos (TFLA) e incorporação em sistemas de liberação de fármacos nanoparticulados, como lipossomas e nanoesferas. Ao final do estudo, os autores concluíram que os análogos da TFLA aumentam a atividade leishmanicida. Observaram ainda, que a incorporação deste a nanosistemas leva a uma melhor taxa de sobrevivência *in vivo* e melhor atividade antiparasitária *in vitro* (Lopes *et al.*, 2016; Antinori, Schifanella & Corbellin, 2012; Kedzierski, Sakthianandeswaren & Curtis, 2009).

## **CONCLUSÃO**

Com a realização deste levantamento bibliográfico, foi possível observar que existem poucos relatos científicos, nos últimos cinco anos (2013 à 2017), relacionando o uso de agentes antiprotozoários incorporados à nanocápsulas, ainda que existam muitas doenças infecciosas causadas por parasitas. A resolução clínica das doenças parasitárias varia desde quadros benignos até formas associadas a graves condições clínicas e risco

de morte evidente. Portanto, os achados deste estudo indicam um vasto campo de pesquisa ainda a ser desenvolvido com relação ao uso da nanotecnologia. O aperfeiçoamento científico nesta área, que ainda se demonstra relativamente menos investido por pesquisadores e governos, terá grande impacto no cenário da saúde pública.

## REFERÊNCIAS

Acharya J, Hildreth, MB, Reese, RN. *In vitro* screening of forty medicinal plant extracts from the United States Northern Great Plains for anthelmintic activity against *Haemonchus contortus* *Vet. Parasitol*, 201(1), 75-81, 2014.

Albanese A, Tang PS, Chan WCW. The effect of nanoparticle size, shape, and surface chemistry on biological systems. *Annu Rev Biomed Eng.*, 14(1), 1–16, 2012.

Ali M, Afzal M, Verma M. *et al.* Therapeutic efficacy of poly (lactic-co-glycolic acid) nanoparticles encapsulated ivermectin (nano-ivermectin) against *brugian filariasis* in experimental rodent model. *Parasitology Research*, 113(2), 681–691, 2014.

Amaral *et al.* Amphotericin B in poly(lactic-co-glycolic acid) (PLGA) and dimercaptosuccinic acid (DMSA) nanoparticles against paracoccidioidomycosis. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 63(1), 526-533, 2009.

Antinori S, Schifanella L, Corbellin M. Leishmaniasis: new insights from an old and neglected disease. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.*, 31(2), 09–118, 2012.

Bahmani M, Saki K, Kopaei MR, Karamati SA, Eftekhari Z, Jelodari M. The most common herbal medicines affecting Sarcomastigophora branches: a review study. *Asian Pacific Journ al of Tropical Medicin*, 7(1), 14-21, 2014.

Baldissera MD, Da silva AS, Oliveira CB, Santos RCV *et al.* Trypanocidal action of tea tree oil (*Melaleuca alternifolia*) against *Trypanosoma evansi* *in vitro* and *in vivo* used mice as experimental model. *Experimental Parasitology*, 141(1), 21-27, 2014.

Barrat GM. Therapeutic applications of colloidal drug carriers. *Pharma. Sci. Technol. Today*, 5(1), 163-171, 2000.

Bhat SP, Rizvi W, Kumar A. Dose-dependent effect of *Coriandrum sativum* Linn. seeds on thermal pain stimulus. *The Journal of Phytopharmacology*, 3(4), 254-258, 2004.

Branquinho RT, Mosqueira VCF, Oliveira-Silva JCV, Simões-Silva MR, Saúde-Guimarães DA, Lana M. Sesquiterpene Lactone in Nanostructured Parenteral Dosage Form Is Efficacious in Experimental Chagas Disease. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 58(4), 2067–2075, 2014.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Doenças infecciosas e parasitárias : guia de bolso. 8º edição. Brasília: Ministério da Saúde, 2010.

Chagas C. New human trypanosomiasis: studies on morphology and evolutionary cycle of *Schizotrypanum cruzi* n. gen., n. sp. etiologic agent of a new human morbid entity. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 1(1), 159–218, 1909.

Colley DG, Secor WE. Immunology of human schistosomiasis. *Parasite Immunol*, 8(1), 347-57, 2014.

Couvreur P, Barrat G, Fattal E, Legrand P, Vauthier C. Nanocapsule technology: a review. *Therapeutic Drug Carrier Systems*, 19(1), 99– 134, 2002.

De mello CGC *et al.* Efficacy of Lychnopholide Polymeric Nanocapsules after Oral and Intravenous Administration in Murine Experimental Chagas Disease. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 60(9), 5215–5222, 2016.

Edrissian G, Rokni MB, Mohebbali M, Nateghpour M, Mowlavi G, Bahadori M. History of medical parasitology and parasitic infections in Iran. *Archives of Iranian Medicine*, 19(8), 601-607, 2016.

Fessi H, Puisieux F, Devissaguet JP, Amoury N, Benita S. Nanocapsules formation by interfacial polymer deposition following solvent displacement. *International Journal of Pharmaceutics*, 55(1), R1-R4, 1989.

Grando TH, Baldissera MD, Gressler LT *et al.* *Melaleuca alternifolia* anthelmintic activity in gerbils experimentally infected by *Haemonchus contortus*. *Experimental Parasitology*, 170(1), 177-183, 2016.

Gressler LT, Oliveira CB, Coradini K. *et al.* Trypanocidal activity of free and nanoencapsulated curcumin on *Trypanosoma evansi*. *Parasitology*, 142(3), 439-48, 2015.

Kedzierski L, Sakthianandeswaren A, Curtis JM *et al.* Leishmaniasis: current treatment and prospects for new drugs and vaccines. *Curr. Med. Chem.*, 16(5), 599–614, 2009.

Klein EY. Antimalarial drug resistance: a review of the biology and strategies to delay emergence and spread. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 41(4), 311-317, 2013.

Krecek RC, Waller PJ. Towards the implementation of the “basket of options” approach to helminth parasite control of livestock: emphasis on the tropics/subtropics. *Vet. Parasitol.*, 139(1), 270-282, 2006.

Kreuter J. Nanoparticles - a historical perspective. *International Journal of Pharmaceutics*, 2006.

Lin S, Kao Y. Tablet Formulation Study of Spray-Dried Sodium Diclofenac Enteric-coated Microcapsules. *Pharmaceutical Research*, 8(7), 919-924, 1991.

Lopes RM. *et al.* Lipid-based nanoformulations of trifluralin analogs in the management of *Leishmania infantum* infections. *Nanomedicine*, 11(2), 153-70, 2016.

Maha ME, El-moslemany RM, Ramadan AA, Amer EL, El-azzouni MZ, El-khordagui LK. Miltefosine Lipid Nanocapsules for Single Dose Oral Treatment of Schistosomiasis Mansoni: A Preclinical Study. *PLoS One*, 10(11), 2015.

Montoya JG. *et al.* Toxoplasmosis. *The Lancet*, 363(9425), 1965-1976, 2004.

Moro P, Schantz PM. Echinococcosis: a review. *Int. J. Infect. Dis.*, 13(1) 125-133, 2009.

Ngotho, Kagira JM, Kariuki C, Maina N, Thuita JK, Mwangangi DM, *et al.* Influence of trypanocidal therapy on the haematology of vervet monkeys experimentally infected with *Trypanosoma brucei rhodesiense*. *Acta Trop*, 119(1), 14-18, 2011.

Nunes VLB. Oshiro ET, Dorval MEC, Garcia WB, Silva AAP, Bogliolo AR. Investigaç o epidemiol gica sobre *Trypanosoma (trypanozoon) evansi* no pantanal sulmato-grossense. Estudo de reservat rios. *Rev. Bras. Parasitol. Vet*, 2(1), 41-44, 1993.

Penzel EP, Gamboa GU, Fabbri J, Ceballos L *et al.* Cystic echinococcosis therapy: Albendazole-loaded lipid nanocapsules enhance the oral bioavailability and efficacy in experimentally infected mice. *Acta Tropica*, 152(1), 185-194, 2015.

Pinto-alphandary H, Andremont A, Couvreur P. Targeted delivery of antibiotics using liposomes and nanoparticles: research and application. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 13(1), 155-168, 2000.

Pissinate K, Martins ED, Schaffazick SR *et al.* Pyrimethamine-loaded lipid-core nanocapsules to improve drug efficacy for the treatment of toxoplasmosis. *Parasitology research*, 113(1), 2013.

Quintanar-guerrero E, Allémann H, Fessi H, Doelker E. Preparation techniques and mechanism of formation of biodegradable nanoparticles from preformed polymers. *Drug Dev. Ind. Pharm*, 24(1), 1113–1128, 1998.

Rodrigues-coura J, De castro SL. A critical review on Chagas disease chemotherapy. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 97(1), 3-24. 2002.

Sahni JK, Baboota S, Ali J. Promising role of nanopharmaceuticals in drug delivery. *Pharma Times*, 10(1), 34–45, 2011.

Sahoo SK, Labhasetwar L. Nanotech approaches to drug delivery and imaging. *Drug discovery today*, 8(24): 1112-1120, 2003.

Schaffazick SR, Guterres SS, Freitas LL, Pohlmann AR. Caracterização e estabilidade físico-química de sistemas poliméricos nanoparticulados para administração de fármacos. *Quim. Nova*, 26(5), 2003.

Souza CF, Baldissera MD, Cossetin LF, Dalla-lana DF, Monteiro SG. Effect of treatment with *Achyrocline satureioides* (free essential oil and nanocapsules) and diminazine acetinate on haematological and biochemical parameters in *Trypanosoma evansi*. *Microbial Pathogenesis*, 105(1), 30-36, 2017.

Vauthier C, Bouchemal K. Methods for the preparation and manufacture of polymeric nanoparticles. *Pharm Res.*, 29(5), 1025-58, 2009.

Visser S, Giatti LL, Carvalho RAC, Guerreiro JCH. Estudo da associação entre fatores socioambientais e prevalência de parasitose intestinal em área periférica da cidade de Manaus (AM, Brasil). *Ciência & Saúde Coletiva*, 16(8), 3481-3492, 2011.

WHO 2015. Chagas disease (American trypanosomiasis). World Health Organization, Genebra, Suíça: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs340/en/> Acesso em: dezembro de 2017.

## **Anexo 2 – Normas de publicação na Revista Brasileira de Farmácia,**

REVISTA BRASILEIRA DE FARMÁCIA (RBF)

BRAZILIAN JOURNAL OF PHARMACY (BJP) ISSN 2176-0667 (online)

### **ESCOPO E POLÍTICA**

A Revista Brasileira de Farmácia (RBF) (Brazilian Journal of Pharmacy - BJP) é um periódico da Associação Brasileira de Farmacêuticos que se mantém desde 1920, atualmente com periodicidade trimestral. O periódico é voltado para a publicação da produção científica dos diversos segmentos do campo das Ciências Farmacêuticas em manuscritos que poderão ser submetido em português, inglês ou espanhol adequado às normas de publicação descritas a seguir. A linha editorial desse periódico enfatiza não só a inovação tecnológica, mas principalmente os possíveis diálogos interdisciplinares viáveis dentro da abordagem científica, e, portanto priorizam tanto os estudos qualitativos quanto os quantitativos que possam contribuir de forma inovadora e crítica para o desenvolvimento da arte de curar plena. Para tanto, o periódico poderá contemplar seções de Artigos de Revisão (sistemática, exaustiva ou não) que contribuam sobre temas de relevância ao campo das Ciências Farmacêuticas, e ainda a proposição de Artigos Originais resultados de pesquisas ou experimentos, Resumos de Teses ou Dissertações defendidas a pelo menos dois anos. O Conselho editorial poderá propor temas específicos, considerados relevantes, com texto de autores convidados, com inserção no debate sobre temas de interesse da comunidade farmacêutica, que igualmente serão submetidos ao processo de revisão por pares.

Os autores devem indicar, em nota de fim de texto após a conclusão do manuscrito, se a pesquisa é financiada, resultado de dissertação de mestrado ou tese de doutorado, e ainda se há conflitos de interesse envolvidos na mesma. Como condução do processo de submissão caberá aos autores o preenchimento e envio dos APENDICES apresentados ao final desse texto.

No caso de artigos que trazem resultados de pesquisas envolvendo seres humanos ou animais, os autores devem explicitar na seção de Metodologia que a pesquisa foi conduzida dentro de padrões éticos exigidos pela Comissão Nacional de Ética em Pesquisa/Conselho Nacional de Saúde/Ministério da Saúde (CONEP/CNS/MS). Deve-se atentar, sobretudo, ao disposto na Resolução CONEP nº 196/96. No caso de experimento

com animais deverá atender aos padrões éticos da Resolução nº 714, de 20 de junho de 2002, publicada pelo Conselho Federal de Medicina Veterinária. O parecer do CEP deve seguir anexado ao processo de submissão.

Antes de enviar seu manuscrito para a RBF confira as etapas para a submissão para garantir a agilidade ao processo que será dividida em duas etapas: A primeira a partir da avaliação inicial da Comissão editorial quanto a identidade do artigo com a política do periódico e adequação as normas de publicação. A segunda etapa prevê a avaliação por pares de revisores.

A revisão final dos trabalhos e adequação às normas ortográficas é de inteira responsabilidade dos próprios autores. O Comitê Editorial não aprovará manuscritos incompletos, fora do escopo da revista e das instruções para os autores.

## **INSTRUÇÕES GERAIS**

Todos os manuscritos devem ser originais e não publicados anteriormente. Cabe salientar que submissão simultânea implicará em sua recusa nesse periódico. As publicações em inglês e espanhol devem ser revisadas por um profissional de edição de língua estrangeira e não garantem o aceite do artigo. O custo da revisão do texto em inglês ou espanhol é de responsabilidade dos autores que são encorajados a buscar profissionais ou empresas qualificados. A RBF reserva os direitos de submeter todos os manuscritos para revisores ad hoc, cujos nomes serão confidenciais e com autoridade para decidir a aceitação ou declínio da submissão. Nos casos de conflito de avaliações entre os pares, não se compromete a seguir com uma terceira avaliação, a decisão contará com avaliação dos pareceres pelo Conselho Editorial.

## **FORMA E APRESENTAÇÃO DOS MANUSCRITOS**

A RBF aceita artigos para as seguintes seções: a) Artigos originais ou de revisão (até 7.000 palavras, incluindo notas e referências, e exclui o Resumo/Abstract. Máximo de 5 figuras, quadro/gráfico ou tabela): textos inéditos provenientes de pesquisa ou análise/revisão bibliográfica. A publicação é decidida pelo Conselho Editorial, com base em pareceres - respeitando-se o anonimato tanto do autor quanto do parecerista (double-blind peer review) - e conforme disponibilidade de espaço. b) Artigos originais por convite (até 8.000 palavras, incluindo notas e referências, e exclui o Resumo/abstract.

Máximo de 5 figuras, quadro/gráfico ou tabela): textos inéditos de temas previamente solicitados pelo editor (a) Chefe ou Conselho Editorial a autores/pesquisadores de reconhecida experiência no campo das Ciências Farmacêuticas, que poderão resultar em artigos resultado de pesquisa ou de revisão. Os artigos originais serão publicados com base em pareceres (double-blind peer review). Apenas artigos que, devido a seu caráter autoral, não podem ser submetidos anonimamente a um parecerista, serão analisados, com ciência do autor, com base em pareceres em que só o parecerista é anônimo (single-blind peer review). c) Resumo de Tese de Doutorado ou Dissertações de Mestrado (até 1500 palavras, incluindo notas e referências. Máximo de 3 figuras, tabela ou quadro/gráfico): Trata-se de um Resumo ampliado de estudos acadêmicos que tenham relevância no campo das Ciências farmacêuticas. Serão aceitos os Resumos de pesquisas que tenham sido defendidas até dois anos antes da publicação da RBF. O número de Resumos não poderá ultrapassar 15% do total de artigos apresentados por edição, e deverá contemplar as seções Introdução, Metodologia, Resultados e Discussão e Conclusão de forma resumida.

### **ALGUMAS CONSIDERAÇÕES PRÉVIAS**

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

durante o processo de submissão deverão ser destacadas em VERMELHO, e devolvida a comissão editorial pelo endereço: [revistabrasileiradefarmacia@yahoo.com.br](mailto:revistabrasileiradefarmacia@yahoo.com.br).

## FORMATAÇÃO DO TEXTO

Os manuscritos deverão utilizar aplicativos compatíveis com o Microsoft Word. Devem ser escritos em página formato A4 com margens de 2 cm, espaçamento duplo, fonte Times New Roman, tamanho 12, justificado. As linhas e páginas devem ser numeradas a partir do Título até a página final. Deve-se adotar no texto apenas as abreviações padronizadas. Por exemplo: Kg (quilograma) A primeira citação da abreviatura entre parênteses deve ser precedida da expressão correspondente por extenso. Por exemplo: Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA)

O recurso de itálico deverá ser adotado apenas para realmente destacar partes importantes do texto, como por exemplo, citações *ipsis literis* de autores consultados, partes de depoimentos, entrevistas transcritas, nomes científicos de organismos vivos e termos estrangeiros. As ilustrações, figuras, esquemas, tabelas e gráficos deverão ser identificadas no texto, conforme apresentação desejada pelo autor, e apresentadas em arquivo separado. Os manuscritos deverão seguir a seguinte estrutura: □ Título: deverá ser conciso e não ultrapassar 30 palavras, informativo, digitado em negrito com letras minúsculas utilizando a fonte Times New Roman (tamanho 14), com exceção da primeira letra, dos nomes próprios e/ou científicos. □ Autores: deverão ser adicionados a um espaço abaixo do título, centralizados, separados por vírgula. O símbolo “&” deve ser adicionado antes do último autor (Ex.: Paulo da Paz, João de Deus & Pedro Bondoso). Inserir os nomes completos dos autores, por extenso, com letras minúsculas com exceção da primeira letra de cada nome. □ Afiliação do autor: cada nome de autor deverá receber um número arábico sobrescrito indicando a instituição na qual ele é afiliado. A lista de instituições deverá aparecer imediatamente abaixo da lista de autores. O nome do autor correspondente deverá ser identificado com um asterisco sobrescrito. O e-mail institucional, endereço completo, CEP, telefone e fax do autor correspondente deverão ser escritos no final da primeira página. □ Resumo (Abstract): deverá ser escrito na segunda página do manuscrito, não deverá exceder 200 palavras, deverá conter informações sucintas que descrevam objetivo da pesquisa, metodologia, discussão/resultados e a conclusão. Os manuscritos escritos em português ou em espanhol devem ter um Resumo traduzido para o inglês (Abstract). O Abstract deve ser digitado na

terceira página do manuscrito e deve ser revisado por um profissional de edição de língua inglesa. Os manuscritos em inglês deverão apresentar um Resumo em português. □ Palavras-chave (Keywords): são fundamentais para a classificação da temática abordada no manuscrito em bancos de dados nacionais e internacionais. Serão aceitas entre 3 e 5 palavras-chave. Após a seleção, sua existência em português e inglês deve ser confirmada pelo(s) autor (es) do manuscrito no endereço eletrônico <http://decs.bvs.br> (Descritores em Ciências da Saúde - Bireme). As palavras-chave (Keywords) deverão ser separadas por vírgula e a primeira letra de cada palavra-chave deverá maiúscula. □ Introdução: Situa o leitor quanto ao tema que será abordado e apresenta o problema de estudo, destaca sua importância e lacunas de conhecimento (justificativa da investigação), e inclui ainda os objetivos (geral e específico) a que se destina discutir. □ Metodologia ou Percorso Metodológico: Nessa seção o autor (es) deve (m) apresentar o percurso metodológico utilizado que apresente o tipo de estudo (se qualitativo ou quantitativo), de base empírica, experimental ou de revisão de forma que identifique a natureza/tipo do estudo. São fundamentais os dados sobre o local onde foi realizada a pesquisa; população/sujeitos do estudo e seus critérios de seleção (inclusão e exclusão) e cálculo amostral. Nos casos de pesquisa experimental cabe a identificação do material, métodos, equipamentos, procedimentos técnicos e métodos adotados para a coleta de dados. Na apresentação do tratamento estatístico/categorização dos dados cabe informar a técnica ou programa utilizado no tratamento e análise. Nos casos de investigação com humanos ou animais cabe informar a data e o número do protocolo da aprovação pelo Comitê de Ética em Pesquisa. Quanto ao estudo de espécies vegetais deve ter a indicação do seu local de coleta (dados de GPS), o país de origem, o responsável pela identificação da espécie e o depósito da exsicata. □ Resultados e Discussão: devem ser apresentados de maneira clara, objetiva e em sequência lógica, utilizando ilustrações (figuras, quadros e tabelas) quando necessário. Deve-se comparar com informações da literatura sobre o tema ressaltando-se aspectos novos e/ou fundamentais, as limitações do estudo e a indicação de novas pesquisas. Nessa seção cabe a análise e discussão crítica da pesquisa. □ Conclusões: apresentar considerações significativas fundamentadas nos resultados encontrados e vinculadas aos objetivos do estudo. □ Agradecimentos: opcional e deverá aparecer antes das referências.

Figuras, Quadro/Tabelas ou Gráficos: Todas as ilustrações devem apresentar um título breve na parte superior e numerada consecutivamente com algarismos arábicos, conforme a ordem em que forem citadas no manuscrito e a legenda com fonte em Times New

Roman, tamanho 12, justificado e com largura máxima de 8,25 cm. As Tabelas devem apresentar dados numéricos como informação central, e não utilizar traços internos horizontais ou verticais. As notas explicativas devem ser colocadas no rodapé da tabela, com os seus respectivos símbolos. Se houver ilustração extraída de outra fonte, publicada ou não, a fonte original deve ser mencionada abaixo da tabela. Não é permitida a utilização de Figura, gráfico, quadro/tabela publicada em outro periódico sem antes pedir autorização prévia dos autores e/ou da revista. Qualquer uma dessas ilustrações com baixa resolução poderá ser excluída durante o processo de diagramação da RBF, ou ainda comprometer o aceite do manuscrito. As fotos deverão garantir o anonimato de qualquer indivíduo que nela constar. Caso os autores queiram apresentar fotos com identificação pessoal, deverão apresentar permissão específica e escrita para a publicação das mesmas.

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

A veracidade das referências é de responsabilidade dos autores. Os exemplos de referências citados abaixo foram adaptados, em sua maioria, do documento original da ABNT (NBR 6023, agosto de 2002). a) Artigos de periódicos: A abreviatura do periódico deverá ser utilizada, em itálico, definida no Chemical Abstracts Service Source Index (<http://www.cas.org/sent.html>) ou na Base de dados PubMed, da US National Library of Medicine (<http://www.pubmed.gov>), selecionando Journals Database. Caso a abreviatura autorizada de um determinado periódico não puder ser localizada, deve-se citar o título completo. Autor (es)\*. Título do periódico em itálico, volume (a indicação do fascículo é entre parênteses): páginas inicial - final do artigo, ano de publicação. Galato D & Angeloni L. A farmácia como estabelecimento de saúde sob o ponto de vista do usuário de medicamentos. Rev. Bras. Farm. 90(1): 14 – 18, 2009. Fonseca VM, Longobuco P, Guimarães EF, Moreira DL, Kaplan MAC. Um teste do formato de nome. Rev. Bras. Farm. 90(1): 14 – 18, 2009. b) Livros: □ Com 1 autor Autor. Título. Edição (a partir da 2a). Cidade: Editora, ano de publicação. Número total de páginas. Casciato DA. Manual

de oncologia clínica. São Paulo: Tecmed, 2008. 1136 p. □ Com 2 autores Lakatos EM & Marconi MA. Metodologia científica. 2. ed. São Paulo: Atlas, 1991. 231 p. □ Com autoria corporativa Brasil.

Ministério da Saúde. Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos. I Fórum Nacional de Educação Farmacêutica: O farmacêutico de que o Brasil necessita (Relatório Final). Brasília, DF, 2008. 68p. □ Capítulos de livros (o autor do capítulo citado é também autor da obra): Autor (es) da obra. Título do capítulo. In: \_\_\_\_\_. Título da obra. Cidade: Editora, Ano de publicação. Capítulo. Paginação da parte referenciada. Rang HP, Dale MM & RITTER JM. In: Quimioterapia do câncer. Farmacologia. 5. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2004. cap. 50, p. 789-809. □ Capítulos de livros (o autor do capítulo citado não é o autor da obra): Autor (es) do capítulo. Título da parte referenciada. In: Autor (es) da obra (ou editor) Título da obra. Cidade: Editora, Ano de publicação. Capítulo. Paginação da parte referenciada. Schenkel EP, Gosmann G & Petrovick PR. Produtos de origem vegetal e o desenvolvimento de medicamentos. In: Simões CMO. (Org.). Farmacognosia: da planta ao medicamento. 5. ed. Porto Alegre: Editora da UFRGS; Florianópolis: Editora da UFSC, 2003. cap. 15, p. 371-400. □ Citação indireta Utiliza-se apud (citado por) nas citações que foram transcritas de uma obra de um determinado autor, mas que na verdade pertence a outro autor. Helper CD & Strant LM. Opportunities and responsibilities in pharmaceutical care. Am. J. Hosp. Pharm. 47: 533-543, 1990. ApudBisson MP. Farmácia Clínica & Atenção Farmacêutica. 2. ed. Barueri: Manole, 2007. p. 3-9. c) Teses, Dissertações e demais trabalhos acadêmicos: Autor. Título (inclui subtítulo se houver). Ano. Cidade. Total de páginas. Tipo (Grau), Instituição (Faculdade e Universidade) onde foi defendida.

Sampaio IR. Etnofarmacologia e toxicologia de espécies das famílias Araceae e Euphorbiaceae. 2008. Rio de Janeiro. 45 p. Monografia (Especialização em Farmacologia), Associação Brasileira de Farmacêuticos. Rio de Janeiro. d) Eventos científicos (Congressos, Seminários, Simpósios e outros): Autor (es). Título do trabalho. Nome do evento, nº do evento. Página. Cidade. País. Ano. Marchioretto CT, Junqueira MER & Almeida ACP. Eficácia anestésica da neocaína (cloridrato de bupivacaína associada a epinefrina) na duração e intensidade da anestesia local em dorso de cobaio. Reunião anual da SBPC, 54, Goiânia, Brasil, 2002. e) Patentes: Devem ser identificadas conforme modelo abaixo e na medida do possível o número do Chemical Abstracts deve ser informado. Ichikawa M, Ogura M & Lijima T. 1986. Antiallergic flavone glycoside from *Kalanchoe pinnatum*. Jpn. Kokai Tokkyo Koho JP 61,118,396,apud Chemical

Abstracts 105: 178423q. f) Leis, Resoluções e demais documentos Conforme o modelo: Brasil. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução de Diretoria Colegiada (RDC) no 44, de 17 de agosto de 2009. g) Banco/Base de Dados Conforme o modelo BIREME. Centro Latino-Americano e do Caribe de Informação em Ciências da Saúde. Lilacs - Literatura Latino-Americana e do Caribe em Ciências da Saúde. Disponível em: <<http://bases.bireme.br/cgi-bin/wxislind.exe/iah/online/?IsisScript=iah/iah.xis&base=LILACS&lang=p>>. Acesso em: 27 ago. 2009. h) Homepage/Website Conforme o modelo: WHO Guidelines for Pharmacological Management of Pandemic (H1N1) 2009 Influenza and other Influenza Viruses. 91 p. Disponível em: <[http://www.who.int/csr/resources/publications/swineflu/h1n1\\_guidelines\\_pharmaceutical\\_mngt.pdf](http://www.who.int/csr/resources/publications/swineflu/h1n1_guidelines_pharmaceutical_mngt.pdf)>. Acesso em agosto de 2009.

## **SUBMISSÃO**

Todos os manuscritos deverão ser submetidos exclusivamente por e-mail: [revistabrasileiradefarmacia@yahoo.com.br](mailto:revistabrasileiradefarmacia@yahoo.com.br) e deverá enviar o texto em programa compatível com word, e com todos os apêndices preenchidos. Os autores deverão informar a área de concentração (Apêndice 1), a categoria do manuscrito (Artigo Original, Artigo de Revisão ou Resumo de Tese/ Dissertação); apresentar carta de encaminhamento ao Editor (a) Chefe (Apêndice 2) e declaração de originalidade e cessão de direitos autorais (Apêndice 3). É responsabilidade dos autores reconhecerem e informar ao Conselho Editorial da existência de conflitos de interesse que possam exercer qualquer influência em seu manuscrito. Desta forma, as relações financeiras ou de qualquer outra ordem deverão ser comunicadas por cada um dos autores em declarações individuais (Apêndice 4). Quanto a Confirmação da submissão: O autor receberá por e-mail um documento com o número do protocolo, confirmando o recebimento do artigo pela RBF. Caso não receba este e-mail de confirmação dentro de 48 horas, entre em contato com o Conselho Editorial da RBF (e-mail: [revistabrasileiradefarmacia@yahoo.com.br](mailto:revistabrasileiradefarmacia@yahoo.com.br)). A Revista Brasileira de Farmácia submeterá os manuscritos recebidos à análise por dois consultores ad hoc, acompanhado de um formulário para a avaliação e que terão a autoridade para decidir sobre a pertinência de sua aceitação, podendo inclusive, rerepresentá-los ao(s) autor (es) com sugestões, para que sejam feitas alterações necessárias e/ou para que os mesmos sejam adequados às normas editoriais da revista.

Solicita-se aos autores que, na eventualidade de reapresentação do texto, o façam evidenciando as mudanças através da cor vermelha como forma de identificação rápida e facilitação do processo de avaliação. Caso necessário poderá o autor dispor de argumentação teórica em carta anexa sumarizando as alterações realizadas ou não, que poderão ser aceitas ou não pelos revisores. Os nomes dos autores e dos avaliadores dos manuscritos permanecerão em sigilo. O trabalho aceito para publicação só poderá seguir para diagramação caso TODOS os autores tenham assinado o termo de publicação (Apêndice 3). Qualquer tipo de solicitação ou informação quanto ao andamento ou publicação do artigo poderá ser solicitado através do e-mail: [revistabrasileiradefarmacia@yahoo.com.br](mailto:revistabrasileiradefarmacia@yahoo.com.br) baseado no número do protocolo recebido pelo autor correspondente. O Conselho Editorial da RBF reserva-se o direito de solicitar informações adicionais sobre os procedimentos éticos executados na pesquisa. O Conselho Editorial da Revista tem plena autoridade de decisão sobre a publicação de manuscritos, quando os mesmos apresentem os requisitos adotados para a avaliação de seu mérito científico, considerando-se sua originalidade, ineditismo, qualidade e clareza. Toda ideia e conclusão apresentadas nos trabalhos publicados são de total responsabilidade do(s) autor (es) e não reflete, necessariamente, a opinião do Editor Chefe ou dos membros do Conselho Editorial da RBF.

### **ITENS DE VERIFICAÇÃO PARA SUBMISSÃO**

Como parte do processo de submissão, os autores deverão verificar a conformidade da submissão em relação a todos os itens listados a seguir. As submissões que não estiverem de acordo com as normas serão devolvidas aos autores. Somente receberão número de protocolo os artigos que estiverem em conformidade com as Normas para Publicação na RBF: 1. O manuscrito encontra-se no escopo da Revista Brasileira de Farmácia. 2. A contribuição é original, inédita e não está sendo avaliada por outra revista. 3. Os arquivos para submissão estão em formato Microsoft Word ou equivalente. 4. O e-mail para envio do manuscrito está disponível. 5. O texto está em espaçamento duplo; fonte tamanho 12, estilo Times New Roman; com figuras e tabelas inseridas no texto, e não em seu final. 6. O texto segue os padrões de estilo e requisitos bibliográficos em Critérios para preparação dos manuscritos (Atenção às citações no texto e referências bibliográficas). 7. Todos os apêndices estão preenchidos (Atenção especial ao preenchimento dos apêndices). 8. Ao submeter um manuscrito, os autores aceitam que o copyright de seu

artigo seja transferido para a Revista Brasileira de Farmácia, se e quando o artigo for aceito para publicação. Artigos e ilustrações aceitos tornam-se propriedade da Revista Brasileira de Farmácia.