

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMB UCO
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

EDSON RENAN BARROS DE SANTANA

**AVALIAÇÃO DA AÇÃO BIOLÓGICA E DA FOTODEGRADAÇÃO DE EMULSÕES
CONTENDO BIFLORINA**

RECIFE

2014

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

EDSON RENAN BARROS DE SANTANA

**AVALIAÇÃO DA AÇÃO BIOLÓGICA E DA FOTODEGRADAÇÃO DE EMULSÕES
CONTENDO BIFLORINA**

RECIFE

2014

EDSON RENAN BARROS DE SANTANA

**AVALIAÇÃO DA AÇÃO BIOLÓGICA E DA FOTODEGRADAÇÃO DE EMULSÕES
CONTENDO BIFLORINA**

Dissertação de Mestrado apresentada à Coordenação do Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco, como parte dos requisitos para obtenção do grau de Mestre em Ciências Biológicas.

Orientadora: Prof.^a Dra. Adriana Fontes

Co-orientadora: Prof.^a Dra. Cláudia Sampaio de Andrade Lima

RECIFE

2014

Catálogo na Fonte:

Bibliotecário Bruno Márcio Gouveia, CRB-4/1788

Santana, Edson Renan Barros de

Avaliação da ação biológica e da fotodegradação de emulsões contendo biflorina
/ Edson Renan Barros de Santana. – Recife: O Autor, 2014.

80 folhas: il.

Orientadores: Adriana Fontes, Cláudia Sampaio de Andrade Lima

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas, 2010.

Inclui bibliografia e anexos

1. Plantas medicinais I. Fontes, Adriana. (orient.) II. Lima, Cláudia Sampaio de Andrade III. Título.

581.634

CDD (22.ed.)

UFPE/CCB-2014-123

EDSON RENAN BARROS DE SANTANA

**AVALIAÇÃO DA AÇÃO BIOLÓGICA E DA FOTODEGRADAÇÃO DE EMULSÕES
CONTENDO BIFLORINA**

Dissertação de Mestrado apresentada à Coordenação do Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco, como parte dos requisitos para obtenção do grau de Mestre em Ciências Biológicas.

Aprovado em: 27 de Fevereiro de 2014.

BANCA EXAMINADORA

Dra. Adriana Fontes
Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas – UFPE (Presidente)

Dr. Thiago Mendonça de Aquino
UFAL (Membro externo)

Dra. Maria Tereza dos Santos Correia
Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas – UFPE (Membro interno)

RECIFE

2014

“Um passo à frente e você não está mais no mesmo lugar”

Chico Science

A João Paulo Rodrigues Barbosa (*in memoriam*) e a todos meus amigos e familiares que não estão mais entre nós e não puderam compartilhar deste momento comigo.

AGRADECIMENTOS

Sempre gosto de pensar que absolutamente nada do que eu faço, foi feito por mim apenas. Cada palavra de apoio, cada pensamento positivo já são por muitas vezes o suficiente para que eu consiga realizar e concluir uma tarefa. Por isso, ao chegar à etapa final deste sonho que se torna realidade, não posso deixar de agradecer a todos e todas que contribuíram, nem que seja com um simples sorriso, para que eu pudesse chegar até aqui;

À FACEPE pela bolsa concedida durante o período de desenvolvimento desta dissertação;

A todos que fazem parte do Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas. Aos professores por todos os ensinamentos e ajuda na construção do conhecimento. Aos funcionários, em especial a Adê (Adenilda), que sempre com aquele jeito meigo ajudava todos os mestrandos na medida do possível;

Às minhas orientadoras, Professora Dra. Adriana Fontes, por ter aceitado me orientar e por toda a paciência e tempo dedicados a mim e ao nosso projeto e à Professora Dra. Cláudia Sampaio de Andrade Lima, por ser uma verdadeira mãe científica e por todos os ensinamentos, mesmo quando eu ainda apenas sonhava em um dia ingressar no mestrado;

Ao Professor Dr. Ricardo Yara, por ter aceitado orientar meu trabalho de conclusão de curso, pois foi a partir dali que as portas foram sendo abertas para eu poder chegar até aqui;

Às Professoras Dra. Beate Saegesser e Kêsia Xisto pela enorme contribuição tanto com experimentos, quanto com os ensinamentos a mim fornecidos;

À Professora Dra. Lêda Cristina da Silva por ter me dado a oportunidade de ingressar na vida científica. E aos amigos contemporâneos do Projeto Química Sem Fronteiras, Anny Karla, Paula Tays, Paula Camila, Arthur e Lincoln, por ter tornado essa experiência inesquecível;

A todos e todas do Laboratório de Biofísica Química, especialmente aos amigos do dia-a-dia, da “bagunça” saudável, especialmente a João Paulo, aluno de iniciação científica que acompanhou o meu trabalho e de fato o realizou comigo, Anna Lívia, Rafael Japa, Dewson, Paulo Euzébio, Isabela (Belinha), Natália, Thiago Jampa, Diogo Lins, Vinícius, Aline Pitt,

Gilvânia, Felipe e todos os outros que fazem ou fizeram parte da rotina deste laboratório, tornando-o sempre um lugar agradável;

A todos os meus familiares que diretamente ou indiretamente contribuíram para que eu pudesse chegar até aqui, em especial minhas avós Josefa e Gercina e meus avôs Sebastião (in memoriam) e Miguel (in memoriam), por terem me “dado” pais maravilhosos;

Ao meu pai José Edson de Santana e minha mãe Jaqueline Barros de Santana Silva, por me darem tudo o que eu sempre precisei, por fazerem de tudo para me incentivar, por fazerem enormes sacrifícios para me educar e por todo o amor que nunca me faltou. Sem vocês nada disso seria possível. São as pessoas mais importantes da minha vida;

Às minhas princesas, minha irmã Erica Raniere, porque eu sei que ela me ama e não vive sem mim e à minha noiva e futura esposa Niedja de Lima Silva, por sempre estar disposta a me ajudar, por sempre me dizer palavras de apoio tão importantes em momentos difíceis, enfim, por ser essa companheira maravilhosa a quem eu pretendo estar junto por toda vida;

Aos meus novos familiares mais queridos, Fábiana Dias (cunhada), seu esposo e meu amigo Júlio Dias e o presente lindo deles para todos nós, Ana Sophia, minha sobrinha e o xodó de todos, que o titio ama e também à minha sogra Dona Bernadete, mesmo eu não sabendo se é permitido agradecer a sogras em trabalhos científicos, mas a minha é uma segunda mãe para mim, aí não tem jeito;

Aos meus amigos da turma do Fundão do Bus de Naza, Arianny (Arê), Camila (Mulinha), Amanda Gonçalves, Tallita, Ivanildo, André, Vânia (a Lenda), Elizânia, Riciene, Amanda Lira, Magno, porque eles sabem que nem mesmo o tempo irá apagar o bem que eles me fizeram durante toda minha graduação e que fazem sempre que nos encontramos;

Aos meus amigos de infância ou de longa data, Sidney, Anderson, Gerson, Gevison, Amilton, Rayff, Railson, Emerson, Raul e Andinho, aos mais recentes, mas que são irmãos para mim, Marcelo Victor (Dedéu), Charles Henrique, Iverson Marques (cunhado/irmão) Paulo Costa e Matheus, além de todos os integrantes da pelada do Salesiano (Tyne, Eivson, Rodolfo, Adriano, Rafael e todos os demais) e a turma do Magic: The Gathering de Camaragibe, por

todas as horas de diversão pra quebrar a rotina e rir um bocado. Para encontrar forças para realizar algo precisamos ser felizes e sem amigos ninguém consegue ser completamente feliz;

A Paulo Victor Gama (Pavito), por me fazer dar ainda mais valor à vida, me dando um exemplo vivo de superação, otimismo, bom humor e fé, mesmo diante de situações difíceis. É um irmão para mim e tenho certeza que teremos décadas ainda pela frente pra podermos nos divertir e rir muito jogando jogar War ou Magic enquanto conversamos sobre as coisas da vida e sobre futebol;

A Deus, pelo dom da vida, por me dar forças para caminhar até aqui, sonhos para seguir em frente e por me conceder a oportunidade de conhecer a todos que fazem parte da minha história;

Meus sinceros agradecimentos.

RESUMO

A *Capraria biflora* L. é uma planta pertencente à família *Scrophulariaceae* que produz em suas raízes um composto violeta denominado biflorina, uma *o*-naftoquinona que possui potencial antimicrobiano frente a bactérias Gram-positivas e fungos, além de ação antitumoral frente a algumas linhagens celulares, como as células de melanoma. Todavia, a biflorina é uma molécula hidrofóbica e fotossensível, o que dificulta sua manipulação e uso. Com o intuito de promover uma veiculação mais efetiva com uma melhor estabilização e preservação da atividade desta substância, neste trabalho preparamos nanoemulsões a partir da biflorina. Para tanto, a biflorina foi obtida do extrato bruto das raízes de *C. Biflora* L. e purificada por meio de cromatografia líquida clássica seguida de recristalização em éter di-isopropílico. Sua estrutura foi confirmada por análises espectroscópicas convencionais como UV-Vis, Infravermelho e RMN de ^1H e ^{13}C . Para a preparação da nanoemulsão foram utilizados cristais de biflorina solubilizados em Tween 80 e Tween 20 e salina (a 0,9%) como fase aquosa. A caracterização da nanoemulsão e de sua estabilidade foi realizada por espectroscopia UV-Vis e espalhamento dinâmico de luz (DLS). As análises de DLS mostraram que as nanoemulsões são estáveis e apresentam um tamanho médio de aproximadamente 82 nm. A fotodegradação da biflorina em forma de nanoemulsão foi avaliada em uma câmara de fotoestabilidade, durante seis horas de exposição sob UV e luz branca, usando como parâmetro comparativo a biflorina dissolvida em etanol. Como controle positivo foi utilizada uma solução de quinino monoclórato diidratado a 2%. A avaliação da fotodegradação foi verificada através de espectroscopia UV-Vis e a fotoproteção conferida à biflorina pela nanoemulsão foi comprovada, visto que a biflorina nanoemulsionada precisou de cerca de três vezes mais tempo de exposição para se degradar em comparação à biflorina dissolvida em etanol. A ação biológica da biflorina foi testada em ensaios com *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Micrococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Candida albicans* e *Candida krusei*, a partir da sua dispersão em meio de cultura líquido, utilizando-se comparativamente, a ação da biflorina em DMSO a 10%. Sua ação biológica foi observada e apresentou atividade frente às espécies representativas dos grupos das bactérias e leveduras, com valores de Concentração Mínima Inibitória (CMI) para *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis* e *Micrococcus luteus* inferiores a 3,12 µg/mL. A CMI para *Escherichia coli* foi maior do que 100 µg/mL, para *Candida albicans*, 12,5 µg/mL e para *Candida krusei* observou-se concentração maior que 50 µg/mL. Os valores de CMI foram semelhantes para a nanoemulsão e para a biflorina solubilizada em DMSO. Portanto, os resultados indicam que a veiculação da biflorina na forma de nanoemulsão preserva a atividade da substância e ainda possui o adicional de oferecer fotoproteção e favorecer sua aplicação em meio aquoso.

Palavras-chaves: biflorina, nanoemulsão, estabilidade, fotoestabilidade, ação biológica.

ABSTRACT

The *Capraria biflora* L. is a plant belonging to the Scrophulariaceae family which produces in its roots a violet compound named biflorin, an *o*- naphthoquinone with antimicrobial activity against Gram-positive bacteria and fungi. The biflorin still has some anti-tumoral activity against some cell lines, such as melanoma cells. However, biflorin is an hydrophobic and photosensitive molecule, which can become difficult its handling and use. In order to promote a more effective vehiculation of this substance with a better stabilization and preservation of its activity, we prepared biflorin nanoemulsions. For this, the biflorin was obtained from the crude extract of the roots of *C. biflora* L., isolated by classic chromatography and purified by recrystallization using isopropyl ether. The biflorin characterizations were performed by conventional spectroscopic methods as UV-Vis, Infrared and ^1H and ^{13}C NMR. The nanoemulsions were prepared by solubilizing the biflorin crystals in Tween 80 and Tween 20, and saline (0.9% NaCl) was used as the aqueous phase. The characterizations of the nanoemulsions and their stability were performed by UV-Vis spectroscopy and dynamic light scattering (DLS). The DLS analysis showed that the nanoemulsions are stable and present an average size of about 82 nm. The photodegradation of the biflorin nanoemulsions were evaluated in a photostability chamber during six hours of exposure of samples to UV and white lights. The photodegradation of the biflorin dissolved in ethanol was also evaluated for comparison and a solution of quinine monohydrochloride dehydrate (2%) was used as positive control. Since the biflorin nanoemulsions required approximately three times of exposure time to degrade compared to biflorin diluted in ethanol, the photoprotection conferred by the nanoemulsions to the biflorin was confirmed. The microbiological activity of the biflorin was evaluated using *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Micrococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Candida albicans* and *Candida krusei*. The biological activity of the biflorin in DMSO (10%) was also evaluated for comparison. The biological tests indicated that the biflorin nanoemulsions were efficient against bacteria and yeast species, with values of Minimum Inhibitory Concentration (MIC) for *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, and *Micrococcus luteus* smaller than 3.12 $\mu\text{g/mL}$. The MIC value for *Escherichia coli* was higher than 100 $\mu\text{g/mL}$, for *Candida albicans* was 12.5 $\mu\text{g/mL}$ and for *Candida krusei* was higher than 50 $\mu\text{g/mL}$. The MIC values were similar for both samples, nanoemulsions and the biflorin in DMSO. Therefore, the results indicate that the vehiculation of biflorin as nanoemulsions maintains the substance activity and also has the additional benefits of photoprotection and vehiculation in aqueous media, improving its applicability for biological systems.

Key-words: biflorin, nanoemulsions, stability, photostability, biological action.

LISTA DE FIGURAS DA REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Figura 1 – <i>Capraria biflora</i> L.....	23
Figura 2 – Raízes de <i>Capraria biflora</i> L.....	25
Figura 3 – Fórmula estrutural da biflorina isolada das raízes de <i>C. biflora</i> L.....	25
Figura 4 – Câmara de Fotoestabilidade convencional (Fonte: Multitec RS).....	32
Figura 5 – Modificações no espectro da azatioprina ao longo do tempo de exposição à luz (MOORE, 1987).....	33
Figura 6 – Esquema da estrutura das emulsões em geral (OLIVEIRA, 2008).....	34
Figura 7 – Estrutura do dioctilsulfosuccinato de sódio.....	35
Figura 8 – Estrutura do hexadecil trimetialmônio.....	36
Figura 9 – Estrutura do polioxietilenossorbitano (polissorbato 80).....	36
Figura 10 – Representação dos fenômenos de coalescência e floculação.....	38
Figura 11 – Representação do processo de cremagem.....	39
Figura 12 – Gráfico característico de uma análise de DLS demonstrando o número de partículas (MALVERN, 2007).....	41
Figura 13 – Gráfico característico de uma análise de DLS demonstrando o volume das partículas (MALVERN, 2007).....	42
Figura 14 - Gráfico característico de DLS para intensidade. (MALVERN, 2007).....	42

LISTA DE FIGURAS DO ARTIGO

Figure 1 – Biflorin in ethanol (solid line) and biflorin nanoemulsions (dashed line) absorption spectra.....	57
Figure 2 – Absorbance of biflorin nanoemulsions (triangle) and biflorin in ethanol (square) at 555 nm according to the time of exposure in a photostability chamber. Error bars from standard deviation.....	59

LISTA DE TABELA DA REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Tabela 1 – Triagem fitoquímica realizada com os extratos hidroalcoólicos de raízes, caule e folhas de <i>Capraria biflora</i> L. (AQUINO, 2003).....	24
Tabela 2 – Espectro antimicrobiano e concentrações mínimas inibitórias (CMI) da biflorina frente a bactérias e fungos (GONÇALVES DE LIMA et al., 1958).....	27
Tabela 3 – Valores dos halos de inibição em diferentes concentrações de biflorina para fungos dermatófitos (Lyra Júnior et al., 1999).....	28
Tabela 4 – Efeito inibitório da biflorina, etoposídeo e doxorubicina no crescimento celular de cinco linhagens de células tumorais (VASCONCELLOS et al., 2004).....	29
Tabela 5 – Teste de atividade biológica da biflorina e seus produtos de degradação pela ação da luz (GONÇALVES DE LIMA, 1961).....	30
Tabela 6 – Interferência da ação da luz sobre a atividade da biflorina frente a fungos dermatófitos (LYRA JR, 1999).....	31

LISTA DE TABELAS DO ARTIGO

Table 1 – Average size and PDI in function of time for biflorin nanoemulsions stored at different conditions of temperature.....58

Table 2 – IMC values for biflorin nanoemulsions and biflorin dissolved in DMSO.....61

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS DA REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

A/O	Água-em-óleo
A/O/A	Água-em-óleo-em-água
CMI	Concentração mínima inibitória
DLS	Espalhamento Dinâmico de Luz (Dynamic Light Scattering)
UV-Vis	Ultravioleta - Visível
IC₅₀	Concentração mínima inibitória de 50%
IUPAC	International Union of Pure and Applied Chemistry
IV	Infravermelho
O/A	Óleo-em-água
O/A/O	Óleo-em-água-em-óleo
PDI	Índice de polidispersão
RMN	Ressonância magnética nuclear
UV	Ultravioleta

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO.....	19
OBJETIVOS.....	21
CAPÍTULO I	
1. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	23
1.1 <i>Capraria biflora</i> L.....	23
1.2 Biflorina.....	25
1.2.1 Características da molécula.....	25
1.2.2 Propriedades Biológicas.....	27
1.3 Fotodegradação.....	31
1.4 Emulsões.....	34
1.4.1 Desestabilização de emulsões.....	37
1.4.2 Caracterização de Emulsões.....	39
REFERÊNCIAS.....	44
CAPÍTULO II	
Artigo em preparação para ser submetido ao International Journal of Antimicrobial agents.....	50
CAPÍTULO III	
3.CONCLUSÕES.....	67
Perspectivas.....	68
ANEXO I	
Guia para formatação do artigo a ser submetido ao International Journal of Antimicrobial Agents.....	70

INTRODUÇÃO

A *Capraria biflora* L. é uma planta arbustiva ou herbácea, natural das Antilhas e da América do Sul, que pode medir até 1,5 m de altura e é pertencente à família *Scrophulariaceae*. Em 1953, foi isolada de suas raízes uma substância violeta que foi denominada biflorina, uma *o*-naftoquinona (6,9-dimetil-3-(4-metil-3-pentenil)nafta[1,8-*bc*]-piran-7,8-diona) prenilada (GONÇALVES DE LIMA *et al.*, 1953).

Os primeiros estudos sobre a biflorina demonstraram que ela possuía potencial antimicrobiano frente a bactérias gram-positivas, álcool-ácido-resistentes e fungos filamentosos (GONÇALVES DE LIMA *et al.*, 1953). Mais recentemente, alguns estudos indicaram que a molécula pode também ter uma ação anti-mutagênica e antitumoral principalmente contra células de melanoma (VASCONCELLOS *et al.*, 2004; VASCONCELLOS *et al.*, 2007) podendo inclusive induzir a apoptose das mesmas, uma vez que as células tratadas com essa substância demonstraram redução do núcleo, condensação da cromatina e formação de corpos apópticos (VASCONCELLOS *et al.*, 2011). A biflorina ainda é capaz de incrementar a atividade antimetastásica do 5-fluorouracil inoculado em melanoma (CARVALHO, 2009), o que demonstrou que essa substância derivada da *C. biflora* L. pode atuar também como um agente imuno-adjuvante (VASCONCELLOS *et al.*, 2007). Alguns estudos também verificaram se a biflorina apresentava citotoxicidade para células V79 (fibroblasto de *hamster*) ou interferia no desenvolvimento de ovos de ouriço. Porém, em ambos os estudos foi constatado que a molécula não causava quaisquer danos a ambos os tipos de sistemas biológicos (VASCONCELLOS *et al.*, 2004; 2010).

De uma forma geral, nesses trabalhos a biflorina foi solubilizada em etanol ou em dimetilsulfóxido (DMSO) e colocada diretamente em contato com os sistemas biológicos. No entanto, a biflorina tem um caráter majoritariamente hidrofóbico, indicando que uma veiculação mais apropriada dessa substância seja capaz de permitir melhores resultados nos testes realizados em meio aquoso. Por outro lado, substâncias como o DMSO e o etanol podem também exercer toxicidade sobre os sistemas biológicos, podendo resultar em consequências indesejáveis numa administração sistêmica e a longo prazo (VIOLANTE *et al.*, 2002).

Estudos realizados alguns anos após a sua descoberta comprovaram experimentalmente que a biflorina é fotossensível, levando a sua degradação quando exposta à luz natural. Foi observado que seu produto de degradação era composto por duas substâncias, uma solúvel e outra insolúvel em éter de petróleo, e que ambas apresentavam

atividade antimicrobiana menor em relação à biflorina não fotodegradada (GONÇALVES DE LIMA *et al.*, 1961). Portanto, esse estudo mostrou que alguns cuidados devem ser tomados durante a manipulação da biflorina em ambientes iluminados, procurando assim evitar os efeitos negativos de sua degradação e garantindo assim a preservação de sua atividade.

As formulações farmacêuticas, como comprimidos e emulsões, dentre outras, podem criar barreiras físicas que podem evitar, ou ao menos reduzir consideravelmente, os efeitos da fotodegradação de substâncias fotossensíveis (BHALEKAR, 2008). Além disto, a interação de um composto de caráter hidrofóbico, como é o caso da biflorina, com as membranas celulares pode ser bastante facilitada e potencializada utilizando esses tipos de sistemas de veiculação.

A partir deste contexto, no presente trabalho, uma nanoemulsão contendo biflorina foi formulada, caracterizada e suas propriedades fotoprotetoras, estabilidade e ação biológica foram verificadas e comparadas com os resultados obtidos utilizando-se soluções de biflorina em DMSO e etanol. Acreditamos que a utilização de uma formulação farmacêutica, que garanta à biflorina uma preservação de sua atividade mesmo após sua exposição à luz, além de viabilizar e aprimorar sua distribuição em meio aquoso, possa estimular o surgimento de novas abordagens e aplicações para esta molécula.

OBJETIVOS

Diante do contexto apresentado, este trabalho tem por objetivos:

Objetivo Geral

Formular e caracterizar nanoemulsões contendo biflorina, avaliando suas propriedades fotoprotetoras e sua ação biológica.

Objetivos específicos

- (a) Coletar, herborizar e depositar a exsicata da *Capraria biflora*;
- (b) Obter a biflorina a partir de extratos das raízes da *Capraria biflora*;
- (c) Caracterizar a biflorina a partir de análises físico-químicas e espectroscópicas;
- (d) Preparar e caracterizar nanoemulsões contendo biflorina;
- (e) Avaliar a fotodegradação da biflorina veiculada em nanoemulsão em comparação à biflorina não emulsionada;
- (f) Avaliar a ação biológica das nanoemulsões contendo biflorina frente a bactérias Gram-positivas, Gram-negativas e leveduras.

CAPÍTULO I

1. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1.1 *Capraria biflora* L.

A *Capraria biflora* L. (Figura 1) é uma espécie pertencente à família Schrophulariaceae, originária das Antilhas e da América do Sul, que habita zonas temperadas ou áreas de clima tropical, apresentando-se como uma planta variável, classificada como arbustiva ou herbácea, podendo medir até 150 cm de altura (MATOS, 1988; AQUINO, 2003).



Figura 1. *Capraria biflora* L.

Presente em diversas regiões do continente americano, em países como Peru, Guiana Francesa, Trinidad e Tobago, México, Curaçao, Guatemala e Bahamas, Estados Unidos e México, a espécie também pode ser encontrada na Ásia, em países como Índia e China. No continente Europeu é utilizada como ornamento (CORRÊA, 1931; MATOS, 1988). No Brasil, distribui-se nos estados de Minas Gerais, Goiás e na faixa litorânea entre o Piauí e Espírito Santo, com ocorrências relevantes nos estados de Pernambuco e do Ceará (MENEZES, 1949; AQUINO, 2003).

A *Capraria biflora* L. é conhecida popularmente no Brasil como balsaminha, chá-da-balsaminha, chá-do-méxico, chá-da-martinica, chá-de-goteira, chá-do-rio, chá-das-antilhas, chá-de-lima, chá-do-maranhão, chá preto, chá-bravo, chá-de-boi, chá-de-calçada, chá-da-

terra, chá-da-américa e chá-de-marajó (CORRÊA, 1984; LORENZI & MATOS, 2002; VASCONCELLOS, 2007).

Dentre as utilizações populares da *C. biflora* L., é relatado que a espécie pode substituir o chá-da-índia no combate a dores no estômago, dispepsia, além de ser utilizada em associação com outras plantas como febrífuga, diurética, estimulante e digestiva, havendo ainda relatos da utilização de uma associação de plantas, incluindo *C. biflora* L., como calmante e para o tratamento de afecções no aparelho urinário. Os infusos feitos com suas folhas e as extremidades floridas podem ser utilizados como sudorífero e contra acidez estomacal (CORRÊA, 1984; CORDEIRO, 1996; AQUINO *et al.*, 2006). Na América Central e do Norte, seu uso é indicado para o tratamento de câibras e edemas nas pernas, bem como a infusão das folhas é utilizada em afecções ovarianas, indigestão e diarreia (MORTON, 1968; VASCONCELLOS, 2007). O extrato aquoso das folhas de *C. biflora* L. foi testado como agente anti-inflamatório no tratamento de edema induzido por carragenina e obteve resultados satisfatórios em comparação com a ação da indometacina (MURO, 2009).

A partir da realização de uma triagem fitoquímica, foram identificadas as classes de componentes químicos que estão presentes em extratos hidroalcoólicos de raízes, caules e folhas de *C. biflora* L. (AQUINO, 2003). Os resultados podem ser observados na Tabela 1.

Tabela 1. Triagem fitoquímica realizada com os extratos hidroalcoólicos de raízes, caule e folhas de *Capraria biflora* L. (AQUINO, 2003).

Extratos hidroalcoólicos			
Classe fitoquímica	Raízes	Caule	Folhas
Alcalóides	-	-	-
Mono, Sesqui e Diterpenóides	+	+	+
Triterpenóides e Esteróides	+	+	+
Saponinas	-	-	-
Açúcares e poliois	+	+	+
Iridóides	-	-	-
Flavonóides	+	+	+
Fenilpropanoglicosídeos	+	+	+
Leucoantocianidinas e Proantocianidinas condensadas	+	-	-
(-) Ausência; (+) Presença			

Os estudos que evidenciaram definitivamente a importância farmacológica da *C. biflora* L. datam da década de 50, quando pesquisadores do Departamento de Antibióticos da Universidade Federal de Pernambuco isolaram de suas raízes (Figura 2) uma substância de cor violeta, com atividade contra bactérias Gram-positivas, álcool-ácido resistentes e fungos, a qual denominaram de biflorina (GONÇALVES DE LIMA, *et al.* 1953).



Figura 2. Raízes de *C. biflora* L.

1.2 Biflorina

1.2.1 Características da molécula

A biflorina é uma *o*-naftoquinona com denominação IUPAC 6,9-dimetil-3-(4-metil-3-pentenil)nafta[1,8-*bc*]-piran-7,8-diona (Figura 3).

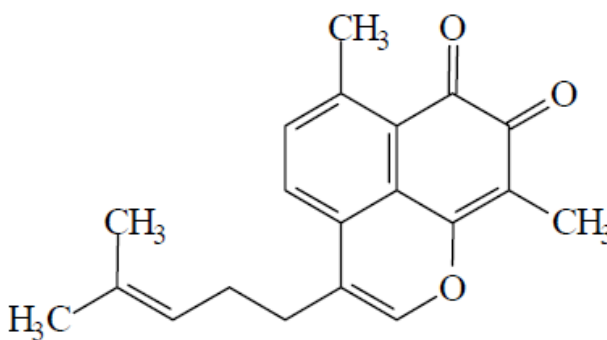


Figura 3. Fórmula estrutural da biflorina isolada das raízes de *C. biflora* L.

As primeiras análises da biflorina permitiram observar que a substância pura apresenta-se sob a forma de cristais aciculares, com reflexos metálicos e coloração violeta (GONÇALVES DE LIMA, 1954). Seu ponto de fusão é de 159 °C e ensaios realizados constataram sua solubilidade em metanol, benzeno, etanol, propanol, butanol, dietilenoglicol, acetona, acetato de amila, ácido acético, éter de petróleo, hexano, tolueno e fenilalanina. No entanto, a biflorina apresenta baixa solubilidade em etilenoglicol, bicarbonato de sódio 5%, glicerina, hidróxido de sódio 5% e em água (MC COWEN & STONE, 1953; AQUINO *et al*, 2006).

Dentre as técnicas utilizadas para o isolamento de produtos de origem natural, as mais comumente aplicadas à extração e purificação da biflorina são a extração em etanol a 70% ou em diclorometano, seguida de cromatografia líquida clássica com sílica gel como fase estacionária e, como eluentes, misturas de tolueno e acetato de etila com gradiente de polaridade. Após a cromatografia, a substância é submetida a seguidas recristalizações em éter de petróleo ou éter di-isopropílico até a obtenção da biflorina com alto grau de pureza (FONSECA *et al.*, 2003; VASCONCELLOS *et al.*, 2004; LYRA JR. *et al.*, 2006).

A caracterização da biflorina foi realizada pela primeira vez por meio de análise de UV-Vis (GONÇALVES DE LIMA, *et al.*, 1953, 1961), porém sua estrutura só veio a ser confirmada décadas depois, devido às limitações da época. Com a obtenção dos espectros de infravermelho e de RMN de C¹³ e H¹, a estrutura da biflorina pôde ser completamente elucidada (LYRA JR. 1999; FONSECA *et al.*, 2003).

A caracterização térmica da biflorina, que foi realizada por Aragão e colaboradores (2002), demonstrou que a mesma possui três estágios de decomposição térmica, que correspondem a temperaturas que variam de aproximadamente 219 °C em seu primeiro estágio de decomposição e chegando a 687 °C no último estágio (ARAGÃO *et al.*, 2002).

Apesar de sua baixa solubilidade em água ser uma característica que dificulta sua manipulação e veiculação, a biflorina possui características químicas farmacologicamente interessantes, principalmente pelo fato de ser uma quinona, classe de substâncias com variadas atividades biológicas relatadas, destacando-se, dentre muitas, as propriedades microbicidas, tripanossomicidas, viruscidas, antitumorais e inibidoras de sistemas celulares reparadores (SILVA *et al*, 2003).

1.2.2 Propriedades Biológicas

Desde que foi isolada das raízes da *C. biflora* L. pela primeira vez, a biflorina é tida como um promissor antibiótico. Ainda no ano de sua descoberta, a sua eficácia como antibiótico foi comprovada por meio de testes realizados em Indianápolis-EUA, no laboratório Eli Lilly (MC COWEN & STONE, 1953). Ensaios com bactérias Gram-positivas, Gram-negativas e leveduras foram realizados para verificar os valores da concentração mínima inibitória da biflorina para estes microrganismos (GONÇALVES DE LIMA *et al.*, 1958) Os resultados constam na Tabela 2.

Tabela 2. Espectro antimicrobiano e concentrações mínimas inibitórias (CMI) da biflorina frente a bactérias e fungos (GONÇALVES DE LIMA *et al.*, 1958).

Microrganismos	CMI (μ g/mL)
<i>Bacillus subtilis</i> 9	0,3
<i>Bacillus subtilis</i> 27	0,1
<i>Bacillus anthracis</i>	0,2
<i>Bacillus cereus</i>	0,2-0,4
<i>Bacillus mycoides</i>	0,20-0,40
<i>Sarcina lutea</i>	0,09
<i>Micrococcus pyogenes</i> var. <i>aureus</i>	0,2
<i>Streptococcus hemolyticus</i>	0,8-1,0
<i>Escherichia coli</i> R	>100
<i>Brucella suis</i>	0,4
<i>Brucella melitensis</i>	0,8
<i>Brucella abortus</i>	>10
<i>Candida albicans</i> 50	50-70
<i>Candida albicans</i> IHM	50-70
<i>Candida tropicalis</i>	50-70
<i>Candida pseudotropicalis</i>	70-100
<i>Candida krusei</i>	100
<i>Candida parakrusei</i>	70-100
<i>Candida stellatoidea</i>	70-100
<i>Candida</i> sp. ME-51	70-100
<i>Cryptococcus neoformans</i> ENCB	1,0-1,5

Décadas depois, novos ensaios sobre a atividade biológica da biflorina foram realizados, avaliando sua ação frente a fungos dermatófitos, verificando-se a formação de halos a partir da aplicação da biflorina em várias concentrações (LYRA JR., 1999) (Tabela 3).

Tabela 3. Valores dos halos de inibição em diferentes concentrações de biflorina para fungos dermatófitos (Lyra Júnior *et al.*, 1999).

Microorganismos	Halos de inibição da biflorina (mm)			
	1µg/ml	5 µg/ml	10 µg/ml	50 µg/ml
<i>Epidermophyton floccosum</i>	09	12	15	16
<i>Microsporum canis</i>	14	15	18	20
<i>Trichophyton gypseum</i>	00	00	00	00
<i>Trichophyton mentagrophytes</i>	14	15	17	18
<i>Trichophyton rubrum</i>	09	10	11	13
<i>Trichophyton shoenlynii</i>	16	20	22	25
<i>Trichophyton SP</i>	13	15	16	17
<i>Trichophyton tonsurans</i>	10	10	12	15

Porém, além da atividade frente a bactérias Gram-positivas, álcool-ácido resistentes e fungos, esta molécula apresenta diversas outras propriedades biológicas relevantes que serão citadas adiante.

A atividade antitumoral exercida por diversas quinonas fez com que a biflorina fosse testada em comparação com fármacos quimioterápicos como inibidora do crescimento de linhagens de células tumorais. As linhagens utilizadas foram CEM e HL-60 (leucemia humana), B-16 (melanoma de rato), HCT-8 (câncer de cólon humano) e MCF-7 (câncer de mama humano). A biflorina apresentou bom desempenho para todas as linhagens testadas (VASCONCELLOS *et al.*, 2004). Os valores de IC₅₀ estão contidos na Tabela 4.

Tabela 4. Efeito inibitório da biflorina, etoposídeo e doxorubicina no crescimento celular de cinco linhagens de células tumorais (VASCONCELLOS *et al.*, 2004).

Linhagem Celular	Biflorina	Etoposídeo	Doxorrubicina
	IC ₅₀ [μ g/ml (μ M)] CI 95% [μ g/ml]	IC ₅₀ [μ g/ml (μ M)] CI 95% [μ g/ml]	IC ₅₀ [μ g/ml (μ M)] CI 95% [μ g/ml]
B16	0.40 (1.20) 1.42 – 1.91	0.11 (0.19) 0.07 – 0.18	0.03 (0.05) 0.02 – 0.04
MCF-7	0.43 (1.30) 1.29 – 1.77	>5.80 (9.85)	0.20 (0.34) 0.17 – 0.24
HCT-8	0.88 (2.80) 4.73 – 12.5	0.11 (0.18) 0.08 – 0.15	0.04 (0.07) 0.03 – 0.05
HL-60	1.95 (6.30) 1.26 – 2.69	0.01 (0.02) 0.01 – 0.02	0.02 (0.03) 0.01 – 0.02
CEM	1.02 (3.30) 1.24 – 1.96	0.03 (0.05) 0.02 – 0.04	0.02 (0.03) 0.01 – 0.02

No mesmo estudo, a citotoxicidade da biflorina em comparação ao etoposídeo e à doxorubicina foi testada, submentendo ovos de ouriço-do-mar à presença destas substâncias. Foi verificado que a biflorina não inibiu o desenvolvimento dos embriões, nem mesmo na maior concentração utilizada nos testes (100 μ g/ml), diferentemente das outras substâncias, que em concentrações mínimas causaram efeitos negativos no desenvolvimento dos ovos (VASCONCELLOS *et al.*, 2004).

A ação imunoadjuvante da biflorina foi avaliada, a partir de sua associação com o 5-Fluorouracil contra tumores do tipo sarcoma 180 e tumor de Ehrlich. Os resultados obtidos demonstraram que a biflorina pura possui atividade inibitória sobre os tumores testados, porém esta atividade é considerada baixa quando comparada à ação do 5-Fluorouracil nas mesmas concentrações. Todavia, quando associados, a biflorina e o 5-fluorouracil conseguem maiores taxas de inibição, comprovando assim o poder imunoadjuvante da biflorina (VASCONCELLOS *et al.*, 2007).

A atividade antimetastásica da biflorina foi avaliada *in vitro* para células tumorais do tipo B16 (melanoma de rato) e MDAMB-435 (melanoma humano). Foi observado que a biflorina age inibindo o processo de metástase, aumentando a sobrevivência dos animais, além de ser capaz de inibir a adesão das células tumorais ao colágeno (um dos mecanismos que favorecem o processo de metástase) e a migração destas células (CARVALHO, 2009). A biflorina também promove a desorganização dos filamentos de actina, modificando a morfologia das células tumorais e alterando a expressão da N-caderina, que é um fator

diretamente relacionado com a invasividade tumoral, e interfere na via de sinalização da PI3K/Atk, que é uma via primordial para o processo de metástase (CARVALHO, 2011).

O efeito inibitório da biflorina frente a células de melanoma foi testado *in vitro* e *in vivo*. Nos testes feitos *in vitro* a biflorina, em comparação com a doxorrubicina, demonstrou atividade inibitória frente a várias linhagens de melanoma em concentrações que variaram de 1,5 a 6 µg/ml, sendo esta atividade inferior à da doxorrubicina em concentração de 0,3 µg/ml, porém bastante relevante. No ensaio *in vivo*, houve significativa redução do volume do tumor nos animais tratados com biflorina, além de um aumento do tempo de sobrevida (VASCONCELLOS *et al.*, 2011). A citotoxicidade da biflorina foi testada em células V79 (fibroblastos de pulmão de hamster), sendo constatado que não houve qualquer dano a estas células (VASCONCELLOS, 2010).

Estudos realizados com a biflorina poucos anos após sua primeira obtenção constataram que a molécula sofre degradação à presença de luz natural, pois foi observado que a biflorina em solução sofria perda de coloração quando exposta à luz ambiente.

Os produtos originados da fotodegradação da biflorina dividem-se inicialmente em dois compostos: um solúvel em éter de petróleo e outro insolúvel no mesmo solvente (GONÇALVES DE LIMA, 1961).

A atividade biológica dos produtos da fotodegradação da biflorina foi testada em comparação à biflorina pura. Os resultados estão expostos na Tabela 5.

Tabela 5. Teste de atividade biológica da biflorina e seus produtos de degradação pela ação da luz (GONÇALVES DE LIMA, 1961).

MICROORGANISMO	Biflorina pura (µg/ml)	Produto 1: Insolúvel em éter de petróleo (µg/ml)	Produto 2: Solúvel em éter de petróleo (µg/ml)
<i>Bacillus subtilis</i>	0,8 – 1,2	50,0	8,0 – 10,0
<i>Staphylococcus aureus</i>	1,2 – 1,6	50,0	6,0 – 8,0
<i>Sarcina lutea</i>	0,1 – 0,2	40,0 – 50,0	1,0 – 2,0
<i>Streptococcus hemolyticus</i>	20,0	50,0	50,0
<i>Escherichia coli</i>	20,0	50,0	50,0
<i>Brucella suis</i>	3,2 – 4,0	30,0 – 40,0	10,0 – 20,0
<i>Mycobacterium humanus</i>	20,0	50,0	40,0 – 50,0
<i>Nocardia asteróides</i>	6,0 – 8,0	50,0	10,0 – 20,0
<i>Candida albicans</i>	1,6 – 3,2	50,0	8,0 – 10,0
<i>Cryptococcus neoformans</i>	20,0	50,0	50,0

Como pode ser visto na tabela 3, um dos produtos da degradação da biflorina, a fração solúvel em éter de petróleo, possui atividade microbicida, porém, bem inferior se comparada à biflorina pura. Já a fração insolúvel em éter de petróleo possui baixa atividade.

Em outro estudo, a partir de um teste com fungos dermatófitos, a influência da luz sobre a ação biológica da biflorina foi avaliada e, novamente, foi observado que a degradação sofrida pela molécula reduz seu potencial como fármaco antibiótico (LYRA JR, 1999). Os resultados deste teste estão apresentados na Tabela 6.

Tabela 6. Interferência da ação da luz sobre a atividade da biflorina frente a fungos dermatófitos (LYRA JR, 1999).

Dermatófitos	Solução de biflorina exposta à luz (halo em mm)	Solução de biflorina ao abrigo da luz (halo em mm)
<i>Epidermophyton floccosum</i>	8,0	15,0
<i>Microsporum canis</i>	7,0	16,0
<i>Trichophyton mentagrophytes</i>	8,0	16,0
<i>Trichophyton rubrum</i>	7,0	10,0
<i>Trichophyton shoenlynii</i>	8,0	21,0
<i>Trichophyton sp</i>	7,0	15,0
<i>Trichophyton tonsurans</i>	7,0	10,0

Estes resultados atentam para uma precaução imprescindível em relação à exposição da biflorina à ação da luz, tendo em vista que para sua atividade ser aproveitada ao máximo a mesma deve ser manipulada no escuro, ou então em algum sistema de veiculação que proporcione a menor exposição possível à luz ambiente. O conhecimento dos mecanismos que desencadeiam os processos de fotodegradação também é importante no controle de seus efeitos.

1.3 Fotodegradação

O fenômeno da fotodegradação pode ser definido como a transformação de um composto em fragmentos reduzidos de menor peso molecular, mediante uma reação química causada pela absorção da radiação UV (ultravioleta) Vis (visível) ou IV (infravermelho), que irá se manifestar na forma de efeitos como a fotodecomposição, fotossensitização e fototoxicidade (TØNNESEN, 2004; RIVAS GRANIZO, 2012).

Para que o processo de fotodegradação seja efetivado, devem existir três componentes: um substrato a ser degradado (substância química, matéria orgânica), um agente para efetuar a fotodegradação (fontes de luz UV, Vis ou IV), além de outros fatores específicos, como temperatura, umidade e presença de oxigênio. Integrados, estes fatores iniciam o processo de fotodegradação (UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO, 2003; RIVAS GRANIZO, 2012).

As reações de fotodegradação geralmente são entendidas como reações de oxidação associadas à absorção de energia, dependentes do comprimento de onda da radiação incidente, sendo inversamente proporcional a esta. Portanto, a energia da radiação UV será maior do que a Vis, e esta última maior que a radiação IV. Consequentemente as radiações absorvidas nas zonas UV e Vis do espectro são mais propensas a ativar reações químicas do que outras zonas de maior comprimento de onda (MOORE, 2004; RIVAS GRANIZO, 2012). Os efeitos causadores dessa degradação geralmente estão associados à incidência de raios solares UVB (290 – 310 nm) e UVA (310 – 400 nm) diretamente sobre os compostos fotossensíveis (MOORE, 1987).

A degradação de compostos por conta da ação da luz UV ou Vis deve ser analisada de forma apropriada. Portanto, o primeiro parâmetro a ser definido para uma análise da fotoestabilidade de um composto ou de uma formulação é a escolha das fontes luminosas adequadas aos ensaios. As câmaras de fotoestabilidade (Figura 4) são as ferramentas mais apropriadas para este tipo de análise, por já contarem com as estruturas corretas, como as fontes luminosas adequadas e superfície de exposição mapeada.



Figura 4. Câmara de Fotoestabilidade convencional (Fonte: Multitec RS).

As câmaras de fotoestabilidade devem ter ação comprovada sobre os compostos analisados, o que pode ser garantido a partir de sua calibração, utilizando-se como padrão substâncias como o quinino monoclórato diidratado (BRASIL, 2005).

A espectroscopia de UV-Vis é uma técnica que valida o estudo de fotodegradação, comprovando a ocorrência ou não da degradação a partir da observação dos espectros de absorbância dos compostos submetidos à análise (MOORE, 1987). Alguns compostos apresentam queda de absorbância quando sofrem degradação, o que caracteriza um efeito de hipocromia. Todavia, alguns compostos apresentam aumento na absorbância após ser degradado, como, por exemplo, o quinino monoclórato diidratado, que apresenta um efeito de hiper Cromia. A Figura 5 mostra um exemplo da modificação no espectro de absorção UV-Vis da azatioprina, verificada após períodos de exposição à luz.

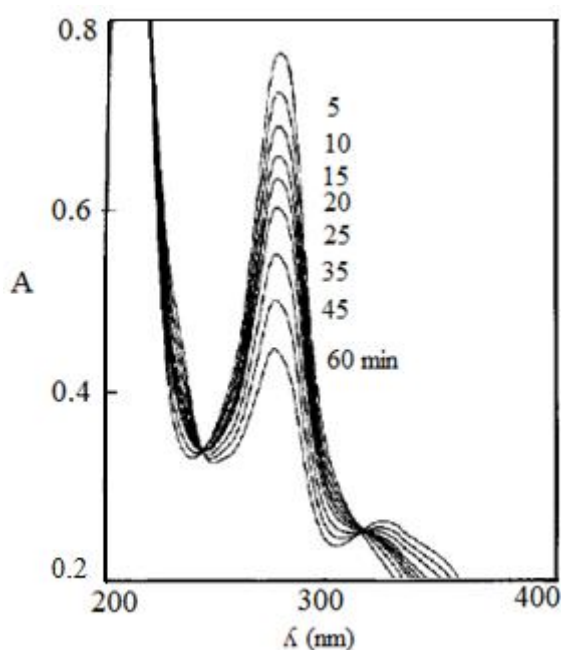


Figura 5. Modificações no espectro da azatioprina ao longo do tempo de exposição à luz (MOORE, 1987).

Produtos destinados ao uso farmacológico requerem ainda mais cuidados em relação aos processos de fotodegradação. Cuidados especiais devem ser tomados durante sua manipulação e armazenagem, pois a degradação desses compostos pela presença da luz irá alterar, geralmente de forma negativa, a atividade farmacológica dessas substâncias, além de, em alguns casos, poder levar à formação de produtos tóxicos (RIVAS GRANIZO, 2012).

Formulações farmacêuticas destinadas à veiculação de fármacos, como nanocápsulas, nanopartículas lipídicas sólidas e emulsões, por exemplo, podem prover estruturas que protegem ou, ao menos, amenizam a ação da luz sobre os compostos fotossensíveis (PRISTA, 2003).

1.4 Emulsões

Quando dois líquidos imiscíveis são agitados em conjunto, uma emulsão temporária é formada a partir da subdivisão de um dos líquidos em pequenos glóbulos. Isto resulta em um grande aumento da área superficial, que é um fenômeno contrariado pela tensão superficial que os líquidos possuem, portanto, o sistema formado é termodinamicamente instável. Naturalmente os glóbulos irão coalescer, as fases serão separadas e um estado de mínimo de energia superficial livre será alcançado (PRISTA, 2003; AULTON, 2005). Contudo, a adição de um agente emulsificante no sistema facilitará o processo de emulsificação, por meio da interação deste componente com as duas fases, formando um complexo na interface dos dois líquidos, que é chamado de filme interfacial (AULTON, 2005).

Portanto, por definição, emulsão é um sistema heterogêneo que consiste em duas fases líquidas imiscíveis, uma das quais encontra-se dispersa no meio da outra na forma de finas gotículas, cujo diâmetro, em geral, excede $0,1\ \mu\text{m}$ (PRISTA, *et al.*, 2003; AULTON, 2005). Quando uma emulsão é constituída por gotículas com tamanho menores que $100\ \text{nm}$ ($1\ \text{nm} = 10^{-9}\ \text{m}$) ela será classificada como uma nanoemulsão (McCLEMENT, 2012). A fase que está presente como gotículas é chamada de fase dispersa, ou interna, e a fase na qual as gotículas encontram-se suspensas é denominada de fase dispersante, contínua ou externa (AULTON, 2005; ALLEN *et al.*, 2007). As emulsões farmacêuticas geralmente são compostas por óleo e água. Podem existir dois tipos principais: óleo-em-água (O/A) e água-em-óleo (A/O), de acordo com o tipo de fase contínua constituinte (Figura 6).

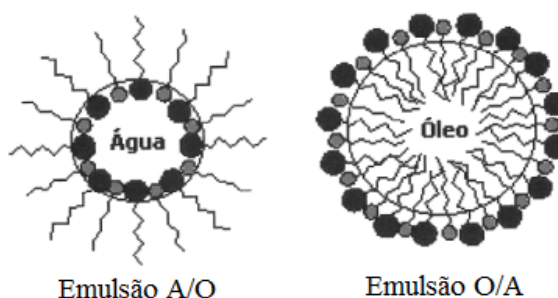


Figura 6. Esquema da estrutura das emulsões em geral (OLIVEIRA, 2008).

Em preparações para uso oral, as emulsões do tipo O/A possibilitam a administração de óleos de sabor desagradável através da dispersão do óleo em um meio dispersante edulcorado e flavorizado (ALLEN *et al.*, 2007). Emulsões A/O possuem um efeito oclusivo e ação emoliente, sendo adequadas ao uso tópico quando objetiva-se, por exemplo, a hidratação das camadas do estrato córneo. Esse tipo de formulação também é útil na limpeza de sujeiras lipofílicas presentes na pele e na produção de cremes umectantes destinados a evitar a perda de umidade da pele (AUTON, 2005; ALLEN, 2007). Existem ainda sistemas de emulsões mais complexos, como o que é composto por uma gotícula de óleo que envolve uma gotícula de água e é suspensa em água, para formar um sistema água-em-óleo-em-água (A/O/A) e seu correspondente (O/A/O). Tais sistemas são chamados de emulsões múltiplas.

Os sistemas emulsionados são estabilizados pela presença dos agentes emulsificantes. Dentre os tipos de agentes emulsificantes que podem ser utilizados na formulação de emulsões destacam-se carboidratos (goma arábica, ágar e pectina), substâncias protéicas (gelatina, gema de ovo e caseína), alcoóis de alto peso molecular (álcool estearílico, álcool cetílico e monoestearato de glicerila) e os tensoativos (ALLEN, 2007). Os tensoativos ou surfactantes são os principais tipos de agentes emulsificantes empregados na produção de emulsões farmacêuticas (AULTON, 2005). Os tensoativos possuem duas regiões distintas em sua estrutura química, uma hidrofílica e outra hidrofóbica, caracterizando-se como compostos anfipáticos, sendo capazes de acumular-se na fronteira entre as fases oleosa e aquosa, reduzindo a tensão na interface desses líquidos e facilitando a formação das emulsões (AULTON, 2005).

Os tensoativos podem ser classificados em aniônicos, catiônicos e não-iônicos. Os tensoativos aniônicos caracterizam-se por serem compostos que, em solução aquosa, dissociam-se formando íons carregados negativamente, que são responsáveis pela sua capacidade emulsionante. Dentre os tensoativos aniônicos estão o dodecanoato de sódio, o dodecil (lauril) sulfato de sódio e o dioctilsulfosuccinato de sódio (Figura 7). São compostos que possuem alta toxicidade, sendo apenas utilizados para administração externa (AULTON, 2005).

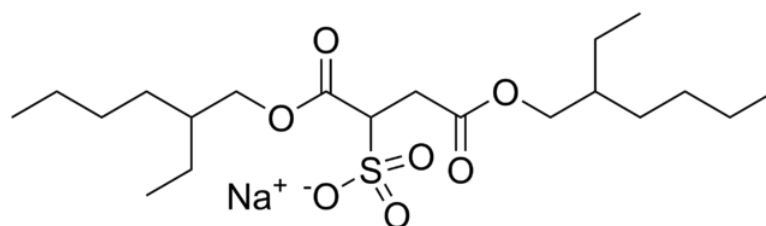


Figura 7. Estrutura do dioctilsulfosuccinato de sódio.

Os tensoativos catiônicos, por sua vez, se dissociam em soluções aquosas formando íons carregados positivamente. São exemplos o iodeto de dodecilpiridínio e o brometo de hexadecil trimetialmônio (cetrimida) (Figura 8). Possuem propriedades conservante e desinfetante, sendo utilizados em formulações de cremes antisépticos para uso externo, devido também à sua toxicidade (AULTON, 2005; ALLEN, 2007).

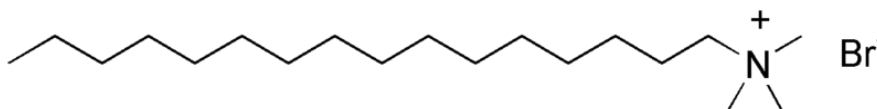


Figura 8. Estrutura do hexadecil trimetialmônio.

Já os tensoativos não-iônicos compreendem substâncias lipossolúveis, que estabilizam emulsões A/O, e hidrossolúveis, utilizadas em formulações O/A. Comumente, tensoativos não-iônicos são combinados visando à obtenção de filmes interfaciais mais complexos e emulsões mais estáveis. Os mais comuns são o monooleato de sorbitano e o monooleato de polioxietilenossorbitano (polissorbato 80) (Figura 9). Apresentam baixas toxicidade e irritabilidade, podendo ser utilizados em formulações para administração oral e parenteral (AULTON, 2005).

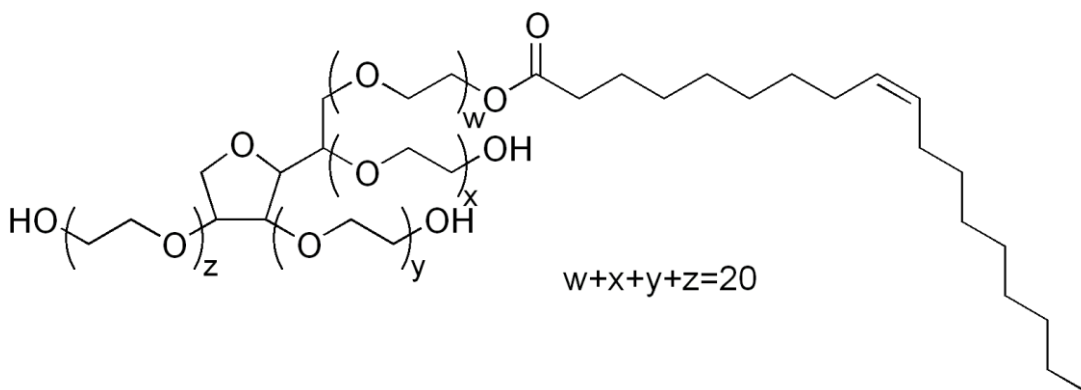


Figura 9. Estrutura do polioxietilenossorbitano (polissorbato 80).

Apesar da característica anfipática, os tensoativos apresentam predominância de uma das regiões de sua estrutura, podendo ser mais hidrofílicos do que hidrofóbicos e vice-versa (ALLEN, 2007). Tensoativos com predominância dos grupos polares tendem a formar emulsões O/A, enquanto que tensoativos com características mais polares formam emulsões A/O (AULTON, 2005).

Quando a escolha dos tensoativos é realizada de acordo com as características dos mesmos em relação ao tipo de emulsão que se deseja fabricar, a tendência é que uma maior estabilidade da formulação seja alcançada. Já no caso das nanoemulsões, que caracterizam-se como dispersões coloidais termodinamicamente instáveis, existe uma condição fundamental para a sua formação e estabilidade que, é a existência de uma tensão interfacial muito baixa, o que só é possível com a inclusão de um segundo composto anfipático na formulação, que funcionará como um co-tensoativo (AULTON, 2005).

Uma emulsão pode ser considerada estável quando o sistema mantém suas características iniciais, como tamanho das gotículas, concentração do composto emulsionado e índice de polidispersão, que é um valor que indica a homogeneidade entre os tamanhos das gotículas distribuídas uniformemente na fase dispersante (AULTON, 2005). O índice de polidispersão, inclusive, por si só já é um parâmetro inicial para verificação da qualidade de uma formulação, pois, valores de PDI superiores a 0,3 são considerados altos e, conseqüentemente, a emulsão é provavelmente pouco estável (PRISTA *et al.*, 2003). Alguns fatores favorecem a longevidade de uma emulsão. Geralmente as condições de armazenamento podem aumentar ou reduzir o tempo que uma emulsão se mantém estável. Condições de temperatura e pH são parâmetros que, quando monitorados e controlados, atuam na preservação da estabilidade do sistema emulsionado. Certas substâncias podem ser incluídas nas emulsões cooperando com a estabilidade das mesmas, agindo como um agente estabilizante, promovendo o prolongamento da estabilidade do sistema emulsionado, como é o caso de tampões, modificadores de densidade (sacarose, dextrose, glicerina ou propilenoglicol), agentes umectantes (glicerina e polietilenoglicol) e antioxidantes (AULTON, 2005).

1.4.1 Desestabilização de emulsões

Apesar de ser uma tendência natural de toda emulsão, a desestabilização ou quebra de uma emulsão ocorre apenas quando o filme interfacial é destruído. O tempo para que isso ocorra irá variar de acordo com a composição da emulsão. Alguns fatores levam à quebra de uma emulsão são:

- Adição de uma substância que seja incompatível com o emulsificante, destruindo, dessa forma, sua propriedade como agente tensoativo;
- Crescimento bacteriano, que normalmente ocorrem em emulsões com materiais protéicos e/ou agentes tensoativos não-iônicos;

- **Mudança de temperatura:** Agentes emulsificantes protéicos podem ser desnaturados e as características de solubilidade dos tensoativos não-iônicos são modificadas de acordo com o aumento da temperatura. Além disso, aquecimento acima de 70° destrói a maioria das emulsões. O congelamento também quebrará uma emulsão, devido à formação do gelo, que rompe o filme interfacial que envolve as gotículas (AULTON, 2005).

O processo de desestabilização das emulsões pode ocorrer de forma discreta, perceptível apenas sob métodos de análise específicos (alterações leves no tamanho das gotículas e elevação do índice de polidispersão), como também de forma que comprometa seu aspecto visual. A seguir estão listados processos que geralmente ocorrem com emulsões em processo de desestabilização:

Floculação: Apesar da presença de um filme interfacial em torno das gotículas, é provável a ocorrência de floculação (Figura 10), que é o agrupamento das gotículas, anteriormente em suspensão, formando uma espécie de floco. É um processo reversível desde que não haja coalescência (Figura 10), apesar de que a proximidade entre as gotículas promovida por pela floculação venha a favorecer sua ocorrência (AULTON, 2005).

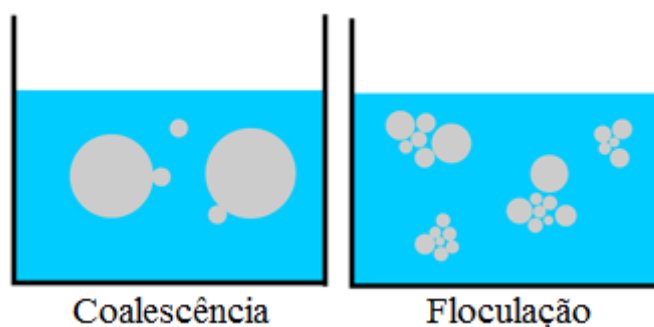


Figura 10. Representação dos fenômenos de coalescência e floculação.

Inversão de fase: Além da solubilidade dos agentes emulsificantes, a proporção entre os volumes das fases de uma emulsão é um fator que contribui para o tipo de emulsão formada. Normalmente as emulsões devem conter menos do que 50% de fase dispersa em seu volume total, sendo que há relatos de emulsões estáveis contendo mais da metade do volume composto por fase interna. Porém, tentativas de incorporar grandes quantidades da fase dispersa podem resultar na quebra da emulsão ou na inversão de fases (conversão de uma emulsão O/A em A/O ou vice-versa). Além disso, se a adição de um adjuvante contribuir para a alteração das características de solubilidade do agente tensoativo, pode vir a alterar o tipo de emulsão. Emulsões estabilizadas por agentes tensoativos não-iônicos, como os polissorbato,

podem inverter de fase sob aquecimento. Isto ocorre devido à quebra das pontes de hidrogênio responsáveis pelas características do polissorbato. Quando sua estrutura é alterada, suas características de solubilidade também se modificam, ocorrendo inversão de fase na emulsão (AULTON, 2005).

Cremagem: Muitas emulsões tendem a formar uma espécie de creme quando estão sob repouso. De acordo com sua densidade relativa à fase contínua, a fase dispersa pode subir à superfície ou descer até o fundo da emulsão, formando camadas de emulsão mais concentrada (Figura 11). Um exemplo básico é a formação da “nata do leite”, que é uma emulsão O/A que sob repouso forma creme em sua superfície. Apesar de não ser um fator de instabilidade tão sério quanto a quebra da emulsão, a cremagem é indesejável, pois deixa a emulsão com uma aparência desleigante e favorece a coalescência, devido à aproximação das gotículas. Alguns fatores podem reduzir a velocidade do processo de cremagem como a redução do tamanho das gotículas (por agitação), a diminuição da diferença de densidade entre as fases constituintes da emulsão e o aumento da viscosidade da fase dispersante, pela adição de agentes espessantes (AULTON, 2005).

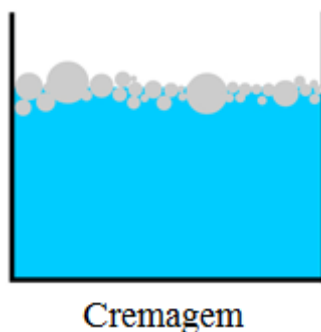


Figura 11. Representação do processo de cremagem.

1.4.2 Caracterização de Emulsões

Um conjunto de técnicas pode ser utilizado para se caracterizar uma emulsão e verificar sua estabilidade ao longo do tempo. Espectroscopia de UV-Vis, aferimento de pH, medida de potencial zeta e espalhamento dinâmico de luz (DLS) são as mais comuns. O potencial zeta é definido como o potencial elétrico no plano hidrodinâmico do cisalhamento, que representa a carga superficial das partículas em relação ao meio que a circunda. Esse potencial pode ser determinado experimentalmente e, como ele reflete a carga efetiva nas

partículas, ele se correlaciona com a repulsão eletrostática entre elas, permitindo assim avaliar a estabilidade de uma suspensão ou emulsão (HOBECO, 2004). Porém, a caracterização através de potencial zeta de suspensões e emulsões formuladas com soluções eletrolíticas, como as que possuem solução salina (NaCl 0,9%) em sua composição, não garante resultados acurados, por conta da interação entre o meio e as partículas produzir um microambiente de superfície não favorável a este tipo de análise. Por sua vez, a técnica de DLS é a que mostra mais características cruciais a serem observadas nas emulsões, pois possibilita a verificação do tamanho das gotículas formadas e o índice de polidispersão do sistema.

O espalhamento dinâmico de luz (DLS), também conhecido como espectroscopia de correlação de fótons (PCS) ou espalhamento de luz quase elástico (QELS) é uma técnica não invasiva e bem estabelecida de medição do tamanho e da distribuição do tamanho de moléculas e partículas (MALVERN, 2012).

Geralmente esta técnica é aplicada na caracterização de partículas, emulsões e moléculas dispersas ou dissolvidas em um líquido. Um feixe de laser é direcionado sobre a amostra e o movimento browniano das partículas ou moléculas em suspensão, que trata-se de um movimento aleatório realizado por partículas quando estão presentes em um fluido quando entram em choque com as outras moléculas ou átomos presentes neste mesmo fluido, faz com que a luz do laser seja espalhada com intensidades diferentes. Partículas maiores se movem mais lentamente e espalham mais o laser. Partículas menores se movem mais rapidamente e espalham menos o laser. (MALVERN, 2012, ANDRADE, 2008). O tamanho das partículas será calculado a partir da equação de Stokes-Einstein:

$$D = \frac{kT}{6\pi\eta a}$$

Onde D é a constante de difusão, k a constante de Boltzmann, T a temperatura, η a viscosidade do solvente e a é o raio das partículas, portanto, esta equação é aplicada para partículas esféricas.

Os resultados de uma análise por DLS podem ser apresentados três formas: distribuição da intensidade de espalhamento, número de partículas e volume das partículas em função do diâmetro (ou raio) (ANDRADE, 2008). Exemplificando de forma prática, em um experimento hipotético, colocamos duas quantidades iguais de determinadas partículas, sendo uma delas dotada de um diâmetro médio de 5 nm e a outra com um diâmetro médio de 50 nm.

Este tipo de distribuição é conhecida como bi-dispersa e fornecerá gráficos de estruturas bem definidas. No caso onde se obtém o número de partículas em função do diâmetro, devemos obter um gráfico com dois picos de igual intensidade (Figura 12) (MALVERN, 2007; ANDRADE, 2008).

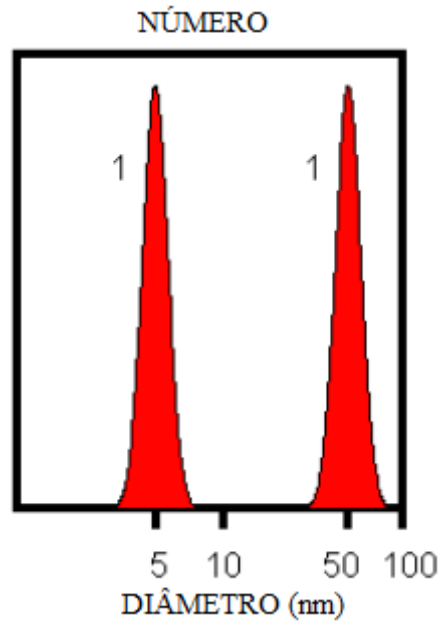


Figura 12. Gráfico característico de uma análise de DLS demonstrando o número de partículas (MALVERN, 2007).

Quando a análise é realizada de acordo com o volume em função do diâmetro, um dos picos apresentados no gráfico será bem maior na banda referente às partículas de 50 nm do que na região correspondente às partículas de 5 nm. Isto ocorre porque o volume de uma esfera é dada pela seguinte equação:

$$V = \frac{4}{3} \cdot \pi r^3$$

Portanto, uma partícula de 5 nm terá um volume de 65,5 nm³, enquanto que a de 50 nm terá um volume de 65.449,8 nm³. Ou seja, a nanopartícula de 50 nm possui um volume 1.000 vezes maior, o que se reflete no gráfico correspondente à Figura 13 (MALVERN, 2007).

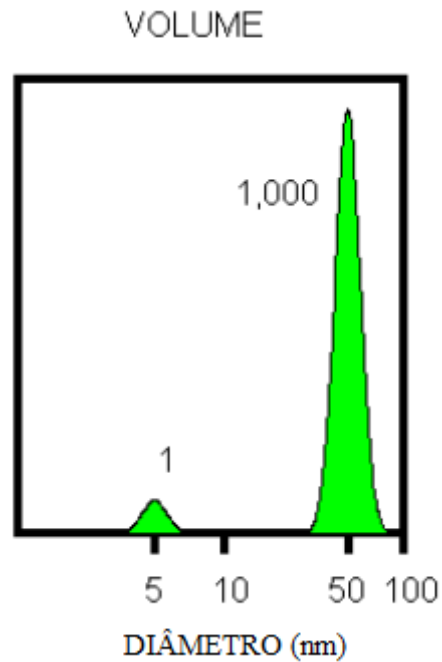


Figura 13. Gráfico característico de uma análise de DLS demonstrando o volume das partículas (MALVERN, 2007).

Por sua vez, o gráfico que demonstrará o resultado como função da intensidade, será resultante da aproximação de Rayleigh (MALVERN, 2007; ANDRADE 2008), ou seja, a intensidade espalhada pela partícula será proporcional à sexta potência do seu diâmetro: $I \sim D^6$. Então a intensidade da partícula de 50 nm será 1.000.000 vezes maior (Figura 14).

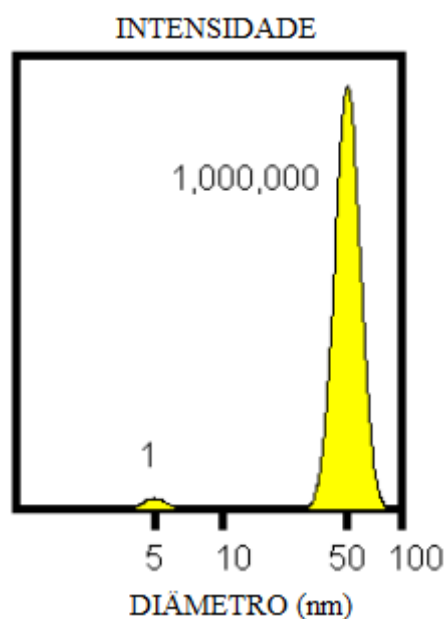


Figura 14. Gráfico característico de DLS para intensidade. (MALVERN, 2007).

Apesar de analisarem as amostras através de parâmetros diferentes, as três abordagens utilizadas pela análise por DLS são eficientes na caracterização de emulsões, viabilizando informações que podem revelar tanto a qualidade da formulação, quanto a estabilidade da mesma.

REFERÊNCIAS

- ALLEN, L. V.; POPOVICH, N. G.; ANSEL, H. C. Formas Farmacêuticas e Sistemas de Liberação de Fármacos. Tradução Elenara Lemos-Senna, *et al.* 8. ed. Porto Alegre: Artmed, 2007.
- ANDRADE, J. E. Síntese, Caracterização e Modificação de Nanopartículas de Prata com 5-Fluorouracil Sob a Influência do pH. 2008. 97 f. Dissertação (mestrado em Física) - Universidade Federal de Sergipe, São Cristóvão, 2008.
- AQUINO, T. M. Caracterização Farmacognóstica de *Capraria biflora* L. e Estudo Biológico e Físico-químico de seus Metabólitos Secundários. 2003. 153 f. Dissertação (mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2003.
- AQUINO, T. M.; LIMA, C. S. A.; ALBUQUERQUE, U. P.; AMORIM, E. L. C. *Capraria biflora* L. (Scrophulariaceae): uma Revisão. *Acta. Farm. Bonaerense*. v. 25, p. 460-7, 2006.
- ARAGÃO, C. F. S.; LIMA, C. S. A.; AMORIM, E. L. C.; AQUINO, T. M.; MACÊDO, R. O. Thermal behavior of biflorin by beans TG and a DSC photovisual system. *Revista Brasileira de Farmacognosia*. v. 12, p. 110-111, 2002.
- AULTON, M. E. Delineamento de Formas Farmacêuticas. Tradução George G. Ortega *et al.* 2. ed. Porto Alegre: Artmed, 2005.
- BHALEKAR, M. R.; HARINARAYANA, D.; MADGULKAR, A. R.; PANDYA, S. J.; JAIN, D. K. *Asian J. Chem.*, v 20(7), p. 5095-5108, 2008.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução – RE n.º 01, de 29 de Julho de 2005. Autoriza, ad referendum, a publicação do Guia para Realização de Estudos de Estabilidade. Brasília: Diário Oficial da União, 2005.

CARVALHO, A. A. Estudo da Atividade Antimetastásica da Biflorina, uma o-Naftoquinona Isolada das Raízes da *Capraria biflora*. 2009. 106 f. Dissertação (mestrado em Farmacologia) – Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2009.

CARVALHO, A. A. Estudo do Potencial Antimetastático da Biflorina. 2011. 120 f. Tese (doutorado em Farmacologia) – Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2011.

CORDEIRO, R.; NUNES, V. A.; ALMEIDA, C. R. Plantas Que Curam. (1) p. 145. São Paulo, 1996.

CORRÊA, M. P. Dicionário das Plantas Úteis do Brasil. Rio de Janeiro, Ministério da Agricultura V. 2, p. 205, 1931.

CORRÊA, M. P. Dicionário das Plantas Úteis do Brasil e das Exóticas Cultivadas. Ed. Imprensa Nacional, Rio de Janeiro, Brasil, V. 2, p. 205, 1984.

DA VIOLANTE, G.; ZERROUK, N.; RICHARD, I.; PROVOT, G.; CHAUMEIL, J. C.; ARNAUD, P. Evaluation of the cytotoxic effect of dimethyl sulfoxide (DMSO) on caco2/TC7 colon tumor cells cultures. *Biol. Pharm. Bull.* v.25, p. 1600-1603, 2002..

FONSECA, A. M.; PESSOA, O. D. L.; SILVEIRA, E. R.; MONTE, F. J. Q.; BRAZ-FILHO, R.; LEMOS, T. L. G. Total assignments of ^1H and ^{13}C NMR spectra of biflorin and bis-biflorin from *Capraria biflora*. *Magnetic Resonance in Chemistry*. v. 41, p. 1038-1040, 2003.

GONÇALVES DE LIMA, O.; D'ALBUQUERQUE, I. L.; LOUREIRO, P.; CARMONA, C. L.; BERNARD, M. Z. Biflorina, novo antibiótico isolado da *Capraria biflora* L. *Rev. Quím. Industrial*. v. 14, p. 2-3, 1953.

GONÇALVES DE LIMA, O.; D'ALBUQUERQUE, I. L.; LOUREIRO, P.; CARMONA, C. L.; BERNARD, M. Z. Novas observações sobre a biflorina, antibiótico isolado da *Capraria biflora* L. *Rev. Quím. Industrial*. v. 249, p. 28-30, 1954.

GONÇALVES DE LIMA, O.; D'ALBUQUERQUE, I. L.; NETO, B. M.; ALBUQUERQUE, M. M. Breve nota sobre a atividade antimicrobiana da biflorina purificada por partição Graig. Rev. Inst. Antibiot. 1/2, p. 95-97, 1958.

GONÇALVES DE LIMA, O.; D'ALBUQUERQUE, I. L.; MAIA, D.; BORBA, M. A. A ação da luz sobre a biflorina. Rev. Inst. Antibiot. v. 3, p. 97-100, 1961.

HOBECO. Corrente de fluxo. www.hobeco.net. 2004. Disponível em <[http://www.hobeco.net/analitica/Corrente de fluxo GLI.pdf](http://www.hobeco.net/analitica/Corrente%20de%20fluxo%20GLI.pdf)> Acesso em: 26 jan., 2014.

LORENZI, H.; MATOS, F. J. A. Plantas Medicinais no Brasil : Nativas e Exóticas Cultivadas. Instituto Plantarum. p. 512, 2002.

LYRA JR., D. P. Isolamento, Atividade Antifúngica e Validação do Método de Doseamento da 3-prenil-6,9 dimetil 7,8 dioxoquinona – Biflorin. 1999. 109 f. Dissertação (mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 1999.

MALVERN. Dynamic Light Scattering: An introduction in 30 minutes. DLS Technical note. p. 1-8. Malvern Instruments Ltd.: United Kingdom, 2007.

MALVERN. Espalhamento dinâmico de luz. www.malvern.com.br. 2012. Disponível em: <<http://www.malvern.com/br/products/technology/dynamic-light-scattering/>> Acesso em: 24 jan., 2014.

MATOS, F. J. A. Plantas Medicinais. Universidade Aberta, p. 2. 1988.

MC COWEN, M. C.; STONE, R. L. Eli Lilly Research Records. v. 18.953. Indianápolis, 1953.

McCLEMENT, D. J. Nanoemulsions *versus* microemulsions: terminology, differences and similarities. *Soft Matter*, v. 8, p. 1719, 2012.

MOORE, D. E. Photophysical and photochemical: aspects of drug stability. In: TØNNESEN, H. H. Photostability of drugs and drug formulations. 2 ed. cap.2, p. 10-40. Boca Raton: CRC Press, 2004.

MOORE, D.E. Principles and practice of drug photodegradation studies. *Journal of Pharmaceutical & Biomedical Analysis*. v. 5, no. 5, p. 441-453, 1987.

MORTON, J. F. A survey of medicinal plants of Curacao. *Economic Botany*. v. 22, p. 87-102, 1968.

MENEZES, A. I. Flora da Bahia. São Paulo, Nacional, v. 264, p. 208, 1949.

MURO, L. V. Contribución a la farmacología antiinflamatoria de la especie *Capraria biflora* L. 2009. 129 f. Tese (doutorado em Ciências da Saúde) – Universidade Central “Marta Abreu” de Las Villas, La Habana, 2009.

OLIVEIRA, B. R. Desenvolvimento e avaliação de nanoemulsões com óleos de *Carapa guianensis* e *Copaifera sp.* e estudo da ação repelente frente a *Aedes aegypti*. 2008. 128 f. Dissertação (mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Faculdade de Ciências de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2008.

PRISTA, L. N.; ALVES, A. C.; MORGADO, R.; LOBO, J. S. Tecnologia Farmacêutica. Vol. 1, 6. ed. Fundação Kalousté Gulbenkian: Lisboa, 2003.

RIVAS GRANIZO, P. E. Avaliação da fotoestabilidade de acetazolamida e loratadina e da capacidade de fotoproteção de seus complexos com ciclodextrinas. 2012. 199 f. Tese (Doutorado em Fármacos e Medicamentos) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012.

SILVA, M. N.; FERREIRA, V. F.; SOUZA, M. C. B. V. Um panorama atual da química e da farmacologia de naftoquinonas, com ênfase na β -lapachona e derivados. *Quim. Nova*. v. 26, no. 3, p. 407-416, 2003.

TØNNESEN, H. H. Photostability of drugs and drug formulations. 2 ed. cap.2, p. 10-40. Boca Raton: CRC Press, 2004.

VASCONCELLOS, M. C.; MONTENEGRO, R. C. MILITÃO, G. C. G.; FONSECA, A. M.; PESSOA, O. D. L.; LEMOS, T. L. G.; PESSOA, C.; MORAES, M. O.; COSTA-LOTUFO, L. V. Bioactivity of biflorin, a typical o-naphthoquinone isolated from *Capraria biflora* L. *Z. Naturforsch.* v. 60, p. 394-398, 2004.

VASCONCELLOS, M. C. “Estudo do Potencial Antineoplásico da Biflorina, o-Naftoquinona Isolada das Raízes de *Capraria biflora* L.”. 2007. 182 f. Tese (doutorado em Farmacologia) - Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2007.

VASCONCELLOS, M. C.; BEZERRA, D. P.; FONSECA, A. M.; PEREIRA, M. R. P.; LEMOS, T. L. G.; PESSOA, O. D. L.; PESSOA, C.; MORAES, M. O.; ALVES, A. P. N. N.; COSTA-LOTUFO, L. V. Antitumor activity of biflorin, an o-naphthoquinone isolated from *Capraria biflora* L. *Biol. Pharm. Bull.* v. 30, p. 1416-1421, 2007.

VASCONCELLOS, M. C.; MOURA, D. J.; ROSA, R. M.; MACHADO, M. S.; GUECHEVA, T. N.; VILLELA, I.; IMMICH, B. F.; MONTENEGRO, R. C.; FONSECA, A. M.; LEMOS, T. L. G.; MORAES, M. E. A.; SAFFI, J.; COSTA-LOTUFO, L. V.; MORAES, M. O.; HENRIQUES, J. A. P. Evaluation of the cytotoxic and antimutagenic effects of biflorin, an antitumor 1,4 0-naphthoquinone isolated from *Capraria biflora* L. *Arch. Toxicol.* v. 84, p. 799-810, 2010.

VASCONCELLOS, M. C.; BEZERRA, D. P.; FONSECA, A. M.; ARAUJO, A. J.; PESSOA, C.; LEMOS, T. L. G.; LOTUFO, L. V.; MORAES, M. O.; MONTENEGRO, R. C. The in-vitro and in-vivo inhibitory activity of biflorin in melanoma. *Melanoma Research.* v. 21, p. 106-114, 2011.



CAPÍTULO II

Artigo em preparação para ser submetido ao *International Journal of Antimicrobial Agents*

ORIGINAL ARTICLE

Santana *et al*

Evaluation of the Biological Activity and Photodegradation of Biflorin Nanoemulsions

Edson R. B. de Santana¹, João P. Ferreira Neto¹, Ricardo Yara², Kêsia X. F. R. de Sena³, Adriana Fontes¹, Cláudia S. de A. Lima^{1*}.

¹ Departamento de Biofísica e Radiobiologia, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, PE, Brazil.

² Departamento de Engenharia Biomédica, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, PE, Brazil.

³ Departamento de Antibióticos, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, PE, Brazil.

Correspondence: Cláudia S. de A. Lima, Av. Prof. Moraes Rego, S/N.

Departamento de Biofísica e Radiobiologia, CCB, UFPE, 50670-901, Recife, PE, Brazil. E-mail: claudia.salima@gmail.com.

Abstract: The *Capraria biflora* L. is a shrub from Scrophulariaceae family which produces in its roots an *o*-naphthoquinone named biflorin. Studies have showed that biflorin in DMSO presents activity against Gram-positive bacteria and fungi and also presents anti-tumoral, immunoadjuvant and antimetastatic activities, mainly against

melanoma cells. However, biflorin is a hydrophobic and photosensitive molecule. In this work, we prepared biflorin nanoemulsions for promoting a more effective vehiculation and preservation of its biological activity. Biflorin was obtained from roots of *C. biflora* L., purified by chromatography and recrystallized using isopropyl ether. Biflorin characterizations were performed by conventional spectroscopic methods as UV-Vis, Infrared and ^1H and ^{13}C NMR spectroscopies. The nanoemulsions were composed by biflorin, Tweens 80 and 20 and saline (0.9%) as dispersant. Nanoemulsions were characterized by UV-Vis spectroscopy and dynamic light scattering (DLS), and the results showed that they are stable and present an average size of about 82 nm. The photodegradation of the biflorin nanoemulsions was evaluated in comparison with biflorin dissolved in ethanol. The results showed that biflorin nanoemulsions required approximately three times of exposure time to degrade compared to biflorin dissolved in ethanol. The biological activity of the biflorin nanoemulsions was tested and compared with biflorin in DMSO (10%). The results indicated that the biflorin nanoemulsions were efficient against Gram-positive bacteria and yeast species, according to previously works. Therefore, the results indicate that the vehiculation of biflorin as nanoemulsions ensure the maintenance of the biological activity of this molecule, as well as its photoprotection. Moreover, vehiculation in aqueous media was improved, favoring its applicability in biological systems.

Key-words: biflorin, nanoemulsions, stability, photostability, biological activity.

1. Introduction

Capraria biflora L. is a perennial shrub native from Antilles and South America that belongs to Schrophulariaceae family [1-3]. The specie have various applications reported in folk medicine, being used as diuretic, stimulant, gastrointestinal, analgesic, among others phytotherapeutical finalities [4-6]. In the 50s, a violet substance, which was denominated biflorin, was isolated from the roots of *C. biflora* L. [7]. Biflorin is an o-naphthoquinone, (6,9-dimethyl-3-(4-methyl-3-pentenyl)naphtha[1,8-bc]-pyran-7,8- dyone), which presents activity against Gram-positive and alcohol-acid resistant bacteria and filamentous fungus [8]. In addition to its anti-microbial activity, recent studies have indicated that biflorin can be used to inhibit the growth of some carcinogen cell lines [9], mainly melanoma cells [10]. Besides, some authors have still reported that biflorin can present immunoadjuvant properties [11] and anti-metastatic activity for melanoma cells also [12-13] Moreover, studies about biflorin cytotoxicity showed that this molecule did not cause any damage to V79 cells (hamster lung fibroblast) and did not present any negative interference on the development of sea urchins eggs [9, 14].

Previous works with biflorin, a few years after its first use, have related that this substance is photodegradable [15]. The authors showed that the biological activity of the biflorin can be drastically decreased after light exposure [15], which can hinder the use and manipulation of this molecule without the loss of its activity. In another work, for example, it was reported that the biflorin biological activity against dermatophyte fungi decreased around 50% after light exposure [16]. Therefore, studies like those indicate that the photosensitivity, as well as, the hydrophobic characteristics of the biflorin, can be relevant factors which can become difficult the utilization of this molecule as a pharmaceutical agent for biological applications. In

this way, novel vehiculation forms of this substance could be used as an alternative to improve its use. Pharmaceutical forms like polymeric nanoparticles, emulsions, and others, may provide physical barriers that can avoid or, at least, considerably decrease the effects of photodegradation on photosensitive molecules [16].

In this context, the aim of this study was to formulate and characterize biflorin nanoemulsions in order to preserve this molecule from the photodegradation and also improve the biocompatibility of this substance. After, we also tested the biological activity of the biflorin nanoemulsions against Gram-positive and Gram-negative bacteria and yeasts. All experiments were done in comparison with biflorin diluted in ethanol and/or DMSO, since these solvents have been usually employed in the biological tests reported in the literature [8-16]. Compared to these previous studies, we believe that the use of nanoemulsions can improve the biflorin vehiculation in aqueous medium expanding its biological applications and prevent, or at least reduce its photodegradation effects, ensuring the maintenance of the biological activity of this molecule, even after a long period of exposure to light.

2. Methodology

2.1 Biflorin Extraction, Purification and Characterization

Biflorin was obtained from the roots of *C. biflora* L. cultivated on the Laboratory of Biophysical Chemistry, Health Sciences Center (CCS), Federal University of Pernambuco (UFPE). A voucher specimen (70.028) is deposited on the Herbarium UFP – Geraldo Mariz, Department of Botanic, Biological Sciences Center (CCB), Federal University of Pernambuco. The roots were collected and dried on a kiln under forced-air circulation at 45° C during 48 hours. Then, they were powdered and thrice extracted with ethanol 70% and crude extract was obtained. The extract was

filtered and dried under vacuum distillation at 45°C for solvent removal. The residue was chromatographed over silica gel, using gradient mixtures of toluene and ethylacetate as eluents. The obtained fractions were grouped according to results obtained from thin layer chromatography (TLC) analysis. Then, the fractions containing biflorin were distilled in rotary evaporator and the residue was recrystallized with diisopropyl ether. After this, the purified crystals of biflorin were collected and dried. The biflorin was characterized by conventional spectroscopic methods as UV-Vis (UV-1800, Shimadzu), infrared (IFS 66, Bruker, USA) and Nuclear Magnetic Resonance ^1H and ^{13}C (Varian Unity plus 300 MHz, Garden State Scientific, USA) and the data was compared with the literature [17,18].

2.2 Nanoemulsions Formulation and Characterization

Biflorin-containing nanoemulsions were prepared with 265 mg of Polysorbate 80 (polyoxyethylene (20) sorbitan monooleate, Tween[®] 80, Vetec/Sigma-Aldrich) and 265 mg of Polysorbate 20 (PEG (20) sorbitan monolaurate, Tween[®] 20, Vetec/Sigma-Aldrich) as surfactants [19]. Dispersed phase was composed by biflorin itself (5 mg) and continuous phase was consisted of saline solution at 0.9%, characterizing an O/A emulsion. The final volume of 250 mL resulted in a concentration of 20 µg/mL. Biflorin crystals and the surfactants were mixed by manual agitation with a glass rod under heating up to 70° C. Then, saline solution was added and the emulsion was finished under ultrasonication by 20 minutes on an ultrasound bath (Ultra Cleaner 1400 A, Unique) at a frequency of 25 kHz. In order to verify the stability of the formulations during the time, samples of nanoemulsions separated into two different treatments and were analyzed in duplicates. The treatment A was stored at room temperature (~25° C) and the treatment B was stored at 4° C. Both treatments were

protected from light. Weekly analysis of UV-Vis spectroscopy (UV-1800, Shimadzu) and dynamic light scattering (Zetasizer Nano ZS 90, Malvern) were performed during one month.

2.3 Photodegradation Study

According to the literature [15], as well as it was mentioned in the introduction of this work, the biflorin is a photodegradable substance and this characteristic can decrease its biological activity against microorganisms after light exposure. Therefore, in this context, we evaluated the photodegradation of biflorin as an ethanolic solution and as nanoemulsions. Samples of biflorin nanoemulsions and biflorin diluted in ethanol 92,8° INPM (Santa Cruz, Brazil), both at 20 µg/mL concentration, were placed on a photostability chamber, containing quinine monohydrochloride dehydrate at 2% (Sigma-Aldrich, USA) samples as positive control for the photodegradation analysis, according to Brazilian Health Surveillance Agency (ANVISA) parameters for photostability studies [20]. The photostability chamber used was equipped with six cool white lamps (58 Watts) and two UV lamps (80 Watts), and was previously calibrated [21]. The experiment was performed with samples under over six hours of light exposure. The test was composed by seven different groups for each type of sample (biflorin nanoemulsions, biflorin in ethanol and quinine), which were analyzed in triplicate: (a) a control group kept outside of the chamber and protected from the light, and (b) six groups that were removed one by one from the chamber after each one hour of interval until complete six hours of experiment. Samples were then analyzed by UV-Vis spectroscopy (UV-1800, Shimadzu) and the absorbance spectra were used to evaluate the photodegradation.

2.4 Biological Assays

Biflorin nanoemulsions efficiency against microorganisms was evaluated in comparison with biflorin diluted in dimethyl sulfoxide (DMSO, Vetec/Sigma-Aldrich), by using minimum inhibitory concentration (MIC) analysis. The experiment was composed by samples on triplicate of each sample: biflorin nanoemulsions and biflorin in DMSO, which was used for dilution instead of ethanol because this solvent is usually applied in experiments of biological activity and it would allow a comparison with the mentioned data [9-13]. The microorganisms used in the test were *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Micrococcus luteus* (Gram-positive), *Escherichia coli* (Gram-negative), *Candida albicans* and *Candida krusei* (yeasts). Bacteria were cultured on Mueller Hinton medium and yeasts on Sabouraud medium. The assay was performed by using 96-well plates and the samples of biflorina were diluted in DMSO, as well as biflorin nanoemulsions, were filtered using 0.22 μm membrane filters (Techno Plastic Products) and distributed by serial dilution in the wells containing the cells (10^7 cells per well) with the respective culture media, resulting in a final volume of 100 μL per well. The concentrations of biflorin, for both kinds of samples, employed in the tests were 100 $\mu\text{g/mL}$, 50 $\mu\text{g/mL}$, 25 $\mu\text{g/mL}$, 12.5 $\mu\text{g/mL}$, 6.25 $\mu\text{g/mL}$ and 3.12 $\mu\text{g/mL}$. Emulsions without biflorin and DMSO (10%) were used as negative control. All procedure were performed under sterile conditions on a laminar flow chamber.

3. Results and Discussion

3.1 Biflorin Nanoemulsions Characterization and Stability

The results from UV-Vis, IR and NMR analysis confirmed the biflorin structure. Typical wavelengths (λ_{max}) in 340 and 555 nm were observed according with UV-Vis

analysis and it was in agreement with the results from literature [16, 18]. Our data for IR and NMR also showed correspondence with the literature [16, 18].

The biflorin nanoemulsions presented a translucent violet aspect. The absorption spectra of biflorin nanoemulsions in comparison with the biflorin in ethanol, Figure 1, showed the existence of the same typical band around 555 nm, confirming the presence of the molecule on the formulation. The band around 340 nm also was present, but it was more accentuated for the biflorin nanoemulsions due to typical surfactants absorptions bands presented in this same UV.

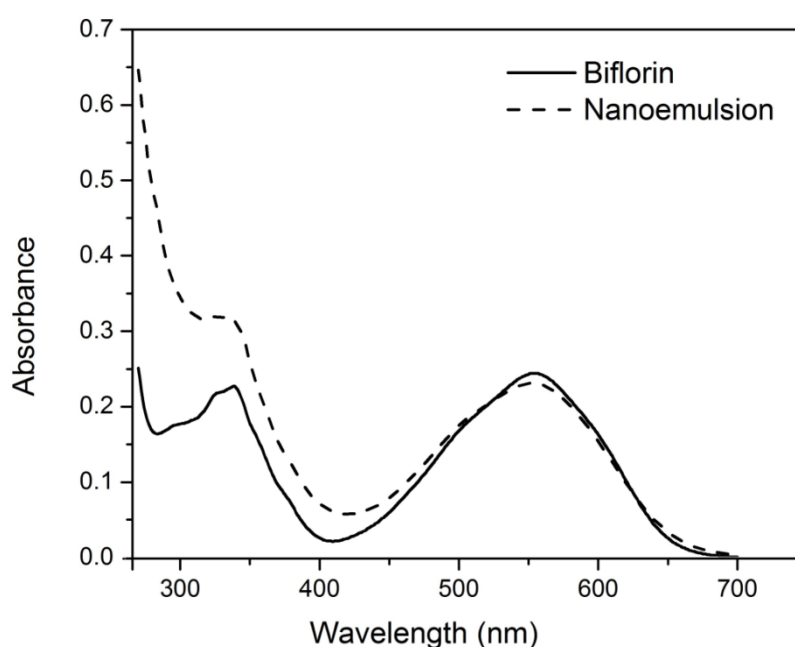


Figure 1. Biflorin in ethanol (solid line) and biflorin nanoemulsions (dashed line) absorption spectra.

Dynamic light scattering analyses were done one day per week during one month. The average sizes and polydispersion index (PDI) for the nanoemulsions from treatment A (4°C) and treatment B (room temperature) are presented in Table 1. Droplets sizes, as well as PDI values, for the treatment A samples did not present any significant change, confirming the stability of the formulation along the period of the analysis. The biflorin nanoemulsions from the treatment A showed a constant

average size around 83 nm during the whole month. On the other hand, droplet sizes of samples from the treatment B increased substantially according to the time and PDI values were always high, showing a destabilization process for these nanoemulsions as a consequence of the storage temperature [22].

Table 1. Average size and PDI in function of time for biflorin nanoemulsions stored at different conditions of temperature.

Treatment A			Treatment B	
Week	Size (nm)	PDI	Size (nm)	PDI
1	82.5 ± 0.1	0.06 ± 0.01	82.1 ± 0.5	0.05 ± 0.01
2	82.6 ± 0.1	0.06 ± 0.01	469.5 ± 180.3	0.30 ± 0.01
3	83.6 ± 1.1	0.08 ± 0.01	570.0 ± 154.7	0.30 ± 0.01
4	82.3 ± 0.7	0.08 ± 0.01	964.0 ± 101.9	0.33 ± 0.01

In addition, the UV-Vis analysis, even for the samples of treatment B, did not present changes in the absorbance values, suggesting that there was no precipitation of the biflorin and that the nanoemulsions concentrations, as well as the properties of the molecule, were preserved for both cases. In this way, despite the smaller stability of the nanoemulsions from treatment B, as those characteristics were maintained, they still could be viable for applications where the droplets sizes is not a crucial factor.

3.2 Photostability Experiment

The degradation of biflorin in form of nanoemulsions and dissolved in ethanol was verified by UV-Vis spectroscopy analysis. The results are shown in Figure 2. The plot of Figure 2 was constructed by using the changes in the biflorin absorbance

band at 555 nm, but we have observed the other bands also varied in the same way. The degradation observed for the biflorin dissolved in ethanol quickly reached critical levels after two hours of exposition. However, the degradation of biflorin nanoemulsions reached approximately this same level only after six hour of exposure.

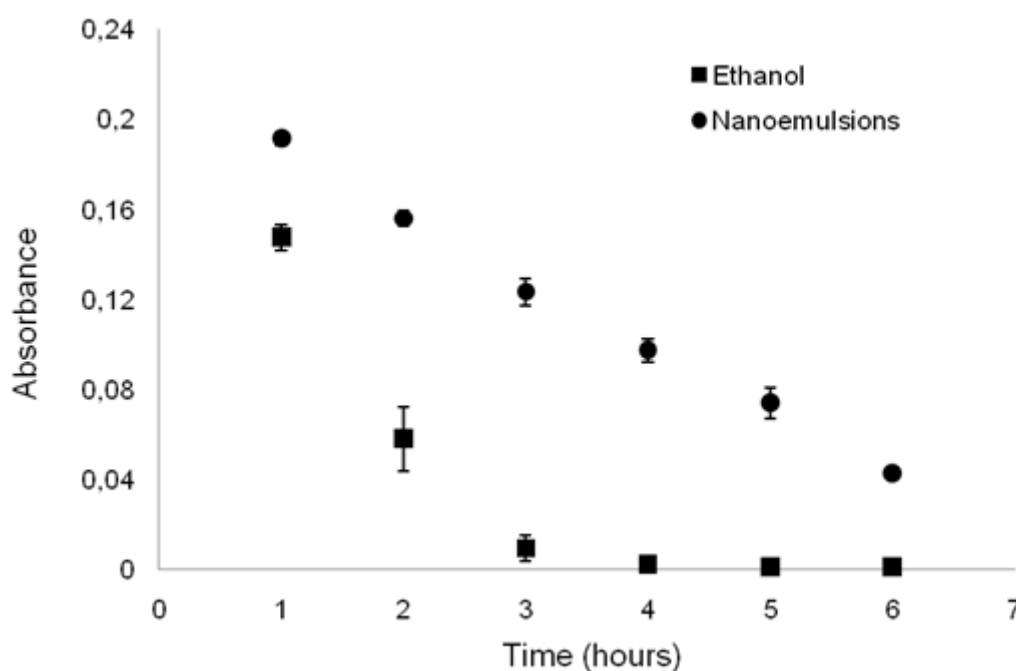


Figure 2. Absorbance of biflorin nanoemulsions (triangle) and biflorin in ethanol (square) at 555 nm according to the time of exposure in a photostability chamber. Error bars from standard deviation.

According to the literature, one hour of light exposure in this photostability chamber can be equivalent to ten hours on naturally well lit environments [21]. Therefore, from the data, we can conclude that the nanoemulsions can provide around three times more of photoprotection to the biflorin and could receive directly natural light exposure for around 60 hours after complete degradation.

Our results are also in accordance with previous ones, which also used pharmaceuticals formulations for the improvement of the photostability of drugs [23,

24]. When the authors tested the effects of UV radiation in tretinoin as nanoemulsions and nanosuspensions in comparison with tretinoin dissolved in methanol, they obtained similar results to ours [23]. Our data also corroborated to those ones obtained from the photostability tests with rutin nanoemulsions in comparison with rutin dissolved in ethanol [24].

3.3 Microbiological Activity

The results obtained for the microbiological tests are presented in the Table 2. The efficiency of both samples, biflorin nanoemulsions and biflorin dissolved in DMSO (10%), against Gram-positive bacteria was confirmed, since the IMC values for these microorganisms were smaller than 3.12 $\mu\text{g/mL}$, the minimal concentration used on the test. For yeasts, the inhibition only occurred at high concentrations of biflorin, around 50 $\mu\text{g/mL}$ for nanoemulsions and 100 $\mu\text{g/mL}$ for the DMSO (10%). This result showed an improvement of the antimicrobial against yeasts activity when the biflorin was vehiculated as nanoemulsions. For Gram-negative bacteria, even at the highest concentrations tested, the biflorin did not present activity in any of the forms of vehiculation applied. It is interesting to note that the biflorin not proved to be completely soluble in DMSO (10%), a result that was not commented in the in previous works developed with this molecule. We also even observed some biflorin precipitation in these samples. In general, these results are according to previous data, where the biflorin activity against Gram-positive bacteria presented IMC values closer to ours and against Gram-negative bacteria did not showed any relevant effect. For yeast, the results reported in the literature are variable, changing according to the type of the specie and, in some cases, to the strain that was used [7, 8, 16].

Table 2. IMC values for biflorin nanoemulsions and biflorin dissolved in DMSO.

Microorganism	Biflorin Nanoemulsions (µg/mL)	Biflorin in DMSO (µg/mL)
<i>Staphylococcus aureus</i>	3.12	3.12
<i>Micrococcus luteus</i>	3.12	3.12
<i>Bacillus subtilis</i>	3.12	3.12
<i>Escherichia coli</i>	50 ~ 100	50 ~ 100
<i>Candida krusei</i>	25 ~ 50	100
<i>Candida albicans</i>	25 ~ 50	>100

4. Conclusion

The characterizations of the biflorin nanoemulsions showed that this formulation is stable for at least one month period when stored at appropriate temperature conditions. We also showed that the photoprotection conferred by the nanoemulsions to the biflorin, reducing the degradation of the molecule, preserving its activity. The antimicrobial activity was maintained, or slightly improved, for all the microorganisms tested. Therefore, by concluding, we believe that the use of a pharmaceutical formulation, like the nanoemulsions developed in this work, that ensures the preservation of the biflorin activity even after light exposure, as well as enable and enhance the distribution of this substance in an aqueous medium, can stimulate new approaches for applications of this molecule.

Acknowledgements

The authors are grateful to Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco (FACEPE), for the financial support and student fellowships.

References

1. Matos, FJA. Plantas Medicinais. Universidade Aberta, p. 2. 1988.
2. Aquino, TM; AMORIM, ELC; LIMA, CSA; ALBUQUERQUE, UP. Padronização Botânica de *Capraria biflora* L. (Schrophulariaceae). *Acta. Farm. Bonaerense*, 2001; 20 (4): 259-263.
3. . Vasconcellos, MC; Bezerra, DP; Fonseca, AM; Pereira, MRP; Lemos, TLG; Pessoa, ODL; *et al.* Antitumor activity of biflorin, an o-naphthoquinone isolated from *Capraria biflora* L. *Biol. Pharm. Bull*, 2007, 30, 1416-1421.
4. Corrêa, MP. Dicionário das Plantas Úteis do Brasil e das Exóticas Cultivadas. Ed. Imprensa Nacional, Rio de Janeiro, Brasil, V. 2, p. 205, 1984.
5. Cordeiro, R; Nunes, VA; Almeida, CR. Plantas Que Curam. (1) p. 145. São Paulo, 1996.
6. Aquino, TM; Lima, CSA; Albuquerque, UP; Amorim, ELC. *Capraria biflora* L. (Scrophulariaceae): uma Revisão. *Acta. Farm. Bonaerense*, 2006; 25: 460-467.
7. Gonçalves de lima, O; D'Albuquerque, IL; Loureiro, P; Carmona, CL.; Bernard, MZ. Biflorina, novo antibiótico isolado da *Capraria biflora* L. *Rev. Quím. Industrial*. 1953; 14: 2-3.
8. Gonçalves de lima, O; D'Albuquerque, IL; Loureiro, P; Carmona, CL; Bernard, MZ. Novas observações sobre a biflorina, antibiótico isolado da *Capraria biflora* L. *Rev. Quím. Industrial*, 1954; 249: 28-30.
9. Vasconcellos, M. C.; Montenegro, RC; Militão, GCG; Fonseca, AM; Pessoa, ODL; Lemos, TLG; *et al.* Bioactivity of biflorin, a typical o-naphthoquinone isolated from *Capraria biflora* L. *Z. Naturforsch*, 2004; 60: 394-398.

10. Vasconcellos, MC; Bezerra, DP; Fonseca, AM; Araujo, AJ; Pessoa, C; Lemos, TLG; *et al.* The in-vitro and in-vivo inhibitory activity of biflorin in melanoma. *Melanoma Research*, 2011; 21: 106-114.
11. Vasconcellos, MC; Bezerra, DP; Fonseca, AM; Pereira, MRP; Lemos, TLG; Pessoa, ODL; *et al.* Antitumor activity of biflorin, an o-naphthoquinone isolated from *Capraria biflora* L. *Biol. Pharm. Bull*, 2007; 30: 1416-1421.
12. Carvalho, AA. Estudo da Atividade Antimetastásica da Biflorina, uma o-Naftoquinona Isolada das Raízes da *Capraria biflora*. 2009. 106 f. Dissertation (masters in Pharmacology) – Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2009.
13. Carvalho, AA; Costa, PM; Souza, LGS; Lemos, TLG; Alves, APNN; Pessoa, CO; Moraes, MO. Inhibition of metastatic potential of B16F10 melanoma cell line in vivo and in vitro by biflorin. *Life Sciences* (1973), 2013, 93, 201-207.
14. Vasconcellos, MC; Moura, DJ; Rosa, RM; Machado, MS; Guecheva, TN; Villela, I; *et al.* Evaluation of the cytotoxic and antimutagenic effects of biflorin, an antitumor 1,4 O-naphthoquinone isolated from *Capraria biflora* L. *Arch. Toxicol.*, 2010; 84: 799-810.
15. Gonçalves de lima, O; D’Albuquerque, IL; Maia, D; Borba, MA. A ação da luz sobre a biflorina. *Rev. Inst. Antibiot.*, 1961; 3: 97-100.
16. Lyra Jr., DP; Lira, AAM; Aquino, TM; Soares, LAL; Santana, DP. Development and Validation of a Chromatographic Method for the Determination of Biflorin obtained from *Capraria biflora* Roots. *Acta Farmacéutica Bonaerense*, 2007, 26 (1), 125-129
17. Bhalekar, MR; Harinarayana, D; Madgulkar, AR; Pandya, SJ; Jain, DK. *Asian J. Chem.*, 2008, 20(7): 5095-5108.

18. Fonseca, AM; Pessoa, ODL; Silveira, ER; Monte, FJQ; Braz-Filho, R; Lemos, TLG. Total assignments of ^1H and ^{13}C NMR spectra of biflorin and bis-biflorin from *Capraria biflora*. *Magnetic Resonance in Chemistry*., 2003; 41: 1038-1040.
19. Silva, CAL. Ação da atividade antioxidante da vitamina E em eritrócitos – Aplicação em hemoterapia. 2013. Dissertation (masters in Biological Sciences) – Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2013.
20. Brasil. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução – RE n.º 01, de 29 de Julho de 2005. Autoriza, ad referendum, a publicação do Guia para Realização de Estudos de Estabilidade. Brasília: Diário Oficial da União, 2005.
21. Azevedo Filho, CA; Filgueiras, DG; Guedes, JPM; Batista, RM; Santos, BS. Considerations on the quinine actinometry calibration method used in photostability testing of pharmaceuticals. *J. Pharm. Biome. Anal.* 2011, 54 (4), 886-888.
22. Bernardi, DS; Pereira, TA; Macial, NR; Bortoloto, J; Viera, GS; Oliveira, GC; *et al.* Formation and stability of oil-in-water nanoemulsions containing rice bran oil: *in vitro* and *in vivo* assessments. *Journal of Nanobiotechnology*., 2011; 9: 44.
23. Lai, F; Pireddu, R; Corrias, F; Fadda, AM; Valenti, D; Pini, E. *et al.* Nanosuspension improves tretinoin photostability and delivery to the skin. *International Journal of Pharmaceutics*, 2013; 458: 104-109.
24. Almeida, JS; Lima, F; Da Ros, S; Bulhões, LOS; Carvalho, LM; Beck, RCR. Nanostructured systems containing rutin: *in vitro* antioxidant activity and photostability studies. *Nanoscale Res Lett*, 2010; 5: 1603-1610.



CAPÍTULO III

3. CONCLUSÕES

- A biflorina extraída da *C. biflora* L. foi caracterizada, confirmando a estrutura da molécula;
- As nanoemulsões formuladas apresentaram aspecto apropriado, como translucidez e coloração violeta, e sua caracterização confirmou que as mesmas possuem o tamanho das gotículas dentro da escala nanométrica e apresentam boa estabilidade ao longo do tempo, quando armazenadas em condições adequadas de temperatura;
- O teste de fotoestabilidade confirmou que a biflorina veiculada na forma de nanoemulsão tem os efeitos de sua degradação pela luz reduzida, podendo, em comparação com a biflorina dissolvida em etanol, levar até três vezes mais tempo para degradar-se a um nível crítico;
- Tanto a nanoemulsão de biflorina quanto a biflorina dissolvida em DMSO (10%) possuem atividade biológica de acordo com os dados da literatura. Porém, as nanoemulsões apresentaram uma atividade antimicrobiana cerca de 50% melhor contra as leveduras em relação à biflorina em DMSO (10%).
- De forma geral, as nanoemulsões de biflorina apresentaram boa atividade biológica com o adicional da fotoproteção e de uma veiculação mais eficaz em meios aquosos.

PERSPECTIVAS

O desenvolvimento de uma nanoemulsão contendo biflorina poderá estimular novas aplicações com essa molécula direcionadas para outros sistemas biológicos, uma vez que essa formulação pode ajudar na preservação da atividade da biflorina em relação à ação da luz sobre esta. Além disto, na forma de nanoemulsão sua aplicação em meio aquoso também pode ser facilitada. Esse estudo também poderá estimular que novas formulações, baseadas por exemplo em lipossomas e nanocápsulas poliméricas, possam ser testadas visando um aumento adicional da fotoproteção conferida pela nanoemulsão. Também vale a pena se testar a incorporação de formulações como esta na produção de loções ou géis para ação tópica da biflorina.



ANEXO I

Guia para formatação do artigo a ser submetido ao International Journal of Antimicrobial Agents.

These guidelines generally follow the "Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical Journals". The complete document appears at <http://www.icmje.org>.

Submission

The Journal now accepts online submissions only. Manuscripts can be submitted at <http://ees.elsevier.com/ijaa/>. Once the manuscript has been uploaded, our system automatically generates an electronic pdf proof, which is then used for reviewing. All correspondence, including notification of the Editor's decision and requests for revisions, will be managed via this system. Authors may also track the progress of their paper using this system to final decision.

If you have any problems submitting your paper through this system, please contact the Editorial Office on: e-mail: ijaa@elsevier.com; tel: +44 (0)1865 843270; fax: +44 (0)1865 843992.

Journal Publishing Agreement

Upon acceptance of an article, authors will be asked to sign a "Journal Publishing Agreement" (for more information on this and copyright see <http://www.elsevier.com/authors>). Acceptance of the agreement will ensure the widest possible dissemination of information. An e-mail (or letter) will be sent to the corresponding author confirming receipt of the manuscript together with a 'Journal Publishing Agreement' form. If excerpts from other copyrighted works are included, the author(s) must obtain written permission from the copyright owners and credit the source(s) in the article. Elsevier has preprinted forms for use by authors in these cases: contact Elsevier's Rights Department, Philadelphia, PA, USA: phone (+1) 215 239 3804, fax (+1) 215 239 3805, e-mail healthpermissions@elsevier.com. Requests may also be completed online via the Elsevier homepage (<http://www.elsevier.com/locate/permissions>). Submission of an article implies that the work described has not been published previously (except in the form of an abstract or as part of a published lecture or academic thesis), that it is not under consideration for publication elsewhere, that its publication is approved by all authors and tacitly or explicitly by the responsible authorities where the work was carried out, and that, if accepted, it will not be published elsewhere in the same form, in English or in any other language, without the written consent of the Publisher.

Authorship

All authors should have made substantial contributions to all of the following: (1) the

conception and design of the study, or acquisition of data, or analysis and interpretation of data, (2) drafting the article or revising it critically for important intellectual content, (3) final approval of the version to be submitted. Upon submission you will be required to complete and upload this form (pdf version or word version) to verify author contributions.

Article types

The following types of manuscripts are routinely accepted (please note that word count is from abstract to references but excluding references):

Original Articles: The form of these articles is discussed fully below; an abstract is required. They should be no longer than 4000 words and 30 references (as above, please note that word count also excludes tables, figures and legends). IJAA will be happy to consider papers of veterinary origin as long as there is some linkage of the scientific work back to human antibiotic use.

Letters: Headings should not be used in a letter; no abstract or keywords are required. The text should be no more than 800 words; there should be a maximum of 5 references and one table or figure may be included.

Reviews: An abstract and keywords are required. The text should be divided into sections by suitable headings. Tables and figures may be used as appropriate for the text. They should be no longer than 5000 words.

Opinions and Commentaries: These take the same form as a review.

Short Communications: These should be no more than 2,500 words, with up to 15 references and a maximum of 3 figures or tables.

Leaders: These tend to be invited papers but unsolicited Leaders are welcome. There are no abstract, keywords or section headings.

Supplementary Data Elsevier accepts electronic supplementary material to support and enhance your scientific research. Supplementary files offer the author additional possibilities to publish supporting applications, high-resolution images, background datasets, sound clips and more. Supplementary files supplied will be published online alongside the electronic version of your article in Elsevier Web products, including ScienceDirect:<http://www.sciencedirect.com>. In order to ensure that your submitted material is directly usable, please provide the data in one of our recommended file formats. Authors should submit the material in electronic format together with the article and supply a concise and descriptive caption for each file. For more detailed instructions please visit our artwork instruction pages at <http://www.elsevier.com/artworkinstructions>. It is strongly advised that Authors provide a list of 4 or 5 potential reviewers (e-mail, phone and fax numbers) who are

knowledgeable in the subject matter, have no conflict of interest, and are likely to agree to review the manuscript. Please ensure that 1 of the potential reviewers is from a different country to the authors.

Submission Checklist

Please ensure that the following are including in your submission:

- " One author designated as corresponding author:
- " Their E-mail address
- " Full postal address
- " Telephone and fax numbers
- " Keywords
- "Cover letter addressed to the Editor, introducing the manuscript and confirming that it is not being submitted concurrently elsewhere"
- " All figure captions
- " All tables (including title, description, footnotes)
- " All necessary files have been uploaded as attachments to the e-mail
- " Manuscript has been spell checked
- " All text pages have been numbered
- " References are in the correct format for this journal
- " All references mentioned in the Reference list are cited in the text and vice versa
- " Permission has been obtained for use of copyrighted material from other sources (including the Web)
- " Colour figures are clearly marked as being intended for colour reproduction or to be reproduced in black-and-white

Manuscripts

Please type all pages with double spacing and wide margins on one side of the paper. Title page, abstract, tables, legends to figures and reference list should each be provided on separate pages of the manuscript.

Use a true type font such as Times New Roman or Arial. The text should be in single-column format. Number the pages. In order to help our reviewers please number each line of the manuscript. Keep the layout of the text as simple as possible. Most formatting codes will be removed and replaced on processing the article. In particular, do not use the options to justify text or to hyphenate words. However, do use bold face, italics, subscripts, superscripts etc. Do not embed 'graphically designed' equations or tables, but prepare these using the facility in Word or as a separate file in Excel. When preparing tables, if you are using a table grid, use

only one grid for each individual table and not a grid for each row. Do not prepare tables in Powerpoint. The electronic text should be prepared in a way very similar to that of conventional manuscripts (see also: <http://www.elsevier.com/authors>). Do not import the figures into the text file but, instead, indicate their approximate locations directly in the electronic text and on the manuscript. See also the section on *illustrations*.

To avoid unnecessary errors you are strongly advised to use the spellchecker.

The title page should include: the title, the name(s) and affiliation(s) of the author(s), an address for correspondence, and telephone/fax numbers for editorial queries. All articles should include an Abstract (a single paragraph) of no more than 250 words and 3-6 key words for abstracting and indexing purposes.

Please **do not split** the article into separate files (title page as one file, text as another, etc.). Ensure that the letter 'l' and digit '1' (also letter 'O' and digit '0') have been used properly, and structure your article (tabs, indents, etc.) consistently. Characters not available on your computer (Greek letters, mathematical symbols, etc.) should not be left open but indicated by a unique code (e.g., α , @, #, etc., for the Greek letter). Such codes should be used consistently throughout the entire text. Please make a list of such codes and provide a key. Do not allow your computer to introduce word splits and do not use a 'justified' layout. Please adhere strictly to the general instructions on style/arrangement and, in particular, the reference style of the journal. It is very important that you save your file in the standard format for the program you are using. If your computer features the option to save files 'in flat ASCII', please do not use it.

Please write your text in good English (American or British usage is accepted, but not a mixture of these). Italics are not to be used for expressions of Latin origin, for example, *in vivo*, *et al.*, *per se*. Use decimal points (not commas); use a space for thousands (10 000 and above).

Provide the following data in your submission (in the order given). This is required for all types of paper submitted.

Title. Concise and informative. Titles are often used in information-retrieval systems. Avoid abbreviations and formulae where possible.

Author names and affiliations. Where the family name may be ambiguous (e.g., a double name), please indicate this clearly. Present the authors' affiliation addresses (where the actual work was done) below the names. Indicate all affiliations with a lower-case superscript letter immediately after the author's name and in front of the appropriate address. Provide the full postal address of each affiliation, including the country name.

Corresponding author. Clearly indicate who is willing to handle correspondence at all stages of refereeing and publication, also post-publication. **Ensure that telephone and fax numbers (with country and area code) are provided in addition to the e-mail address and the complete postal address.**

Present/permanent address. If an author has moved since the work described in the article was done, or was visiting at the time, a 'Present address' (or 'Permanent address') may be indicated as a footnote to that author's name. The address at which the author actually did the work must be retained as the main, affiliation address. Superscript Arabic numerals are used for such footnotes.

Abstract. A concise and factual abstract is required (maximum length 250 words). The abstract should state briefly the purpose of the research, the principal results and major conclusions. An abstract is often presented separately from the article, so it must be able to stand alone. Do not cite references in the abstract. Non-standard or uncommon abbreviations should be avoided in the abstract, but if essential they must be defined at their first mention in the abstract itself.

Keywords. Immediately after the abstract, provide a maximum of 6 keywords, using British spelling and avoiding general and plural terms and multiple concepts (avoid, for example, 'and', 'of'). Be sparing with abbreviations: only abbreviations firmly established in the field may be eligible. These keywords will be used for indexing purposes.

Abbreviations. Define abbreviations that are not standard in this field at their first occurrence in the article: in the abstract but also in the main text after it. Ensure consistency of abbreviations throughout the article.

Subdivision of the article. Divide your article into clearly defined and numbered sections. Subsections should be numbered 1.1 (then 1.1.1, 1.1.2, ?), 1.2, etc. (the abstract is not included in section numbering). Use this numbering also for internal cross-referencing: do not just refer to 'the text.' Any subsection may be given a brief heading. Each heading should appear on its own separate line.

Introduction. State the objectives of the work and provide an adequate background, avoiding a detailed literature survey or a summary of the results.

Experimental/Materials and methods. Provide sufficient detail to allow the work to be reproduced. Methods already published should be indicated by a reference: only relevant modifications should be described. Include in figure legends and table texts technical details of methods used, while describing the methods themselves in the main text.

Results/Discussion. This should explore the significance of the results of the work, not repeat them. A combined Results and Discussion section is often appropriate in a Short Communication but not in an Original Article. Avoid extensive citations and discussion of published literature.

Acknowledgement. Collate acknowledgements in a separate section at the end of the article and do not, therefore, include them on the title page, as a footnote to the title or otherwise. When the work included in a paper has been supported by a grant from any source, this must be indicated. A connection of any author with companies producing any substances or apparatus used in the work should be declared. Authors will be asked to respond to a form e-mailed to them when their paper is accepted (see the 'conflict of interest' section below). All contributors who do not meet the criteria for authorship as defined above should be listed in an acknowledgements section. Examples of those who might be acknowledged include a person who provided purely technical help, writing assistance, or a department chair who provided only general support. Authors should disclose whether they had any writing assistance and identify the entity that paid for this assistance.

References. References should be numbered consecutively (with parentheses) as they appear in the text. Type the reference list with double spacing on a separate sheet. References should accord with the system used in *Uniform requirements for manuscripts submitted to biomedical journals* (N Engl J Med 1991;324:424-428).

Examples:

- 1 Taylor DN, Sanchez JL, Candler W et al. Treatment of traveller's diarrhea: ciprofloxacin plus loperamide compared with ciprofloxacin alone. *Ann Intern Med* 1991;114:731-734.
- 2 Mackowiak PA, ed. *Fever. Basic Mechanisms and Management*. New York: Raven Press, 1991.
- 3 Rubin M, Pizzo PA, Monotherapy in neutropenic cancer patients. In: Peterson PK, Verhoef J, eds. *Antimicrobial Agents Annual 3*. Amsterdam: Elsevier, 1988.

Please note that all authors should be listed when six or less; when seven or more, list only the first six and add 'et al.'. Do not include references to personal communications, unpublished data or manuscripts either 'in preparation' or 'submitted for publication'. If essential, such material may be incorporated into the appropriate place in the text. *Recheck references in the text against reference list after your manuscript has been revised.*

Illustrations. Photographs should be presented as high quality jpg (jpeg) or tiff files with high contrast. Magnification should be indicated by a line representing the actual scale of reproduction (0.1 mm, 1mm or 10 mm); the use of magnification factors is to be avoided

where possible. Illustrations will not be redrawn by the Publisher: line figures should be suitable for direct reproduction. They should be prepared with black on white background, or be black-and-white images; *they should be completely and consistently lettered, the size of the lettering being appropriate to that of the illustration, taking into account the necessary reduction in size.*

Illustrations should be designed to fit either a single column (84 mm wide) or the full text width (175mm). However, if specifically requested by the author(s), plates may be reproduced larger than the typeset area; all originals for these should have the same proportions to achieve uniformity in their presentation. *N.B. When plates are required to fill the entire page, the originals should have the dimensions 215 x 285 mm and contain no essential information or labelling near the edges.* Further information about artwork can be found on the World Wide Web: access under <http://www.elsevier.com/locate/authorartwork>

Colour figures. Colour figures will be included subject to the authors' agreement to defray the cost.

Specific remarks *Mathematical formulae.* Present simple formulae in the line of normal text where possible. In principle, variables are to be presented in italics. Use the solidus (/) instead of a horizontal line,

e.g., X_p/Y_m

Powers of e are often more conveniently denoted by exp. Number consecutively any equations that have to be displayed separate from the text (if referred to explicitly in the text).

Tables. Number tables consecutively in accordance with their appearance in the text. Place footnotes to tables below the table body and indicate them with superscript lowercase letters. Avoid vertical rules. Be sparing in the use of tables and ensure that the data presented in tables do not duplicate results described elsewhere in the article.

Nomenclature and units. Follow internationally accepted rules and conventions: use the international system of units (SI). If other quantities are mentioned, give their equivalent in SI.

DNA sequences and GenBank Accession numbers. Many Elsevier journals cite 'gene accession numbers' in their running text and footnotes. Gene accession numbers refer to genes or DNA sequences about which further information can be found in the databases at the National Center for Biotechnical Information (NCBI) at the National Library of Medicine. Elsevier authors wishing to enable other scientists to use the accession numbers cited in their papers via links to these sources, should type this information in the following manner:

For each and every accession number cited in an article, authors should type the accession number in **bold, underlined text**. Letters in the accession number should always be capitalised. (See example below.) This combination of letters and format will enable Elsevier's typesetters to recognise the relevant texts as accession numbers and add the required link to GenBank's sequences.

Example: GenBank accession nos. **AI631510** , **AI631511** , **AI632198** , and **BF223228**), a B-cell tumour from a chronic lymphatic leukaemia (GenBank accession no. **BE675048**), and a T-cell lymphoma (GenBank accession no. **AA361117**).

Authors are encouraged to check accession numbers used very carefully. **An error in a letter or number can result in a dead link.** In the final version of the **printed article**, the accession number text will not appear bold or underlined. In the final version of the **electronic copy**, the accession number text will be linked to the appropriate source in the NCBI databases enabling readers to go directly to that source from the article.

Editorial Review

All manuscripts are subject to peer review. If changes are requested, revisions received later than 3 months after this request will be treated as new submissions.

Accepted Papers

Once a paper has been accepted, the only changes possible are in relation to any queries raised by the Technical Editor or Typesetter.

Proofs

One set of page proofs in PDF format will be sent by e-mail to the corresponding author (if we do not have an e-mail address then paper proofs will be sent by post). Elsevier now sends PDF proofs which can be annotated; for this you will need to download Adobe Reader version 7 available free from <http://www.adobe.com/products/acrobat/readstep2.html>. Instructions on how to annotate PDF files will accompany the proofs. The exact system requirements are given at the Adobe site: <http://www.adobe.com/products/acrobat/acrrsystemreqs.html#70win>. If you do not wish to use the PDF annotations function, you may list the corrections (including replies to the Query Form) and return to Elsevier in an e-mail. Please list your corrections quoting line number. If, for any reason, this is not possible, then mark the corrections and any other comments (including replies to the Query Form) on a printout of your proof and return by fax, or scan the pages and e-mail, or by post.

Please use this proof only for checking the typesetting, editing, completeness and correctness of the text, tables and figures. Significant changes to the article as accepted for publication

will only be considered at this stage with permission from the Editor. We will do everything possible to get your article published quickly and accurately. Therefore, it is important to ensure that all of your corrections are sent back to us in one communication: please check carefully before replying, as inclusion of any subsequent corrections cannot be guaranteed. Proofreading is solely your responsibility. Note that Elsevier may proceed with the publication of your article if no response is received.

Language and language services

Authors who require information about language editing and copyediting services pre- and post-submission please visit <http://www.elsevier.com/languageediting> or our customer support site at <http://epsupport.elsevier.com> for more information.

Page charges

The Journal does not charge a submission fee.

Queries

All questions arising after acceptance of a manuscript by the editor, especially those relating to proofs, publication and reprints should be directed to the publishers, Elsevier Ireland Ltd., Elsevier House, Brookvale Plaza, East Park, Shannon, Co. Clare, Ireland. Tel: +353 61 709600, Fax: +353 61 709100, E-mail: support@elsevier.com. In the USA and Canada: For further information, contact Elsevier Inc., Attn: Journal Information Center, 360 Park Avenue South, New York, NY 10010, USA. Tel: +1 212 6333750; Fax: +1 212 6333990; Telex: 420-643 AEP Ui; E-mail: usinfo-f@elsevier.com.

Policy and Ethics

Declarations

Upon submission you will be required to complete and upload this form (pdf version or word version) to declare funding, conflict of interest and to indicate whether ethical approval was sought. This information must also be inserted into your manuscript under the acknowledgements section with the headings below. If you have no declaration to make please insert the following statements into your manuscript:

Funding: None

Competing interests: None declared

Ethical approval: Not required

Ethics

Work on human beings that is submitted to IJAA should comply with the principles laid down in the Declaration of Helsinki; Recommendations guiding physicians in biomedical research involving human subjects. Adopted by the 18th World Medical Assembly, Helsinki, Finland,

June 1964, amended by the 29th World Medical Assembly, Tokyo, Japan, October 1975, the 35th World Medical Assembly, Venice, Italy, October 1983, and the 41st World Medical Assembly, Hong Kong, September 1989. The manuscript should contain a statement that the work has been approved by the appropriate ethical committees related to the institution(s) in which it was performed and that subjects gave informed consent to the work (see declarations section above). Studies involving experiments with animals must state that their care was in accordance with institution guidelines. Patients' and volunteers' names, initials, and hospital numbers should not be used.

Competing interests

See the declarations section above. All authors must disclose any financial and personal relationships with other people or organisations that could inappropriately influence (bias) their work. Examples of potential conflicts of interest include employment, consultancies, stock ownership, honoraria, paid expert testimony, patent applications/registrations, and grants or other funding.

Role of the funding source

See the declarations section. All sources of funding should be declared. Authors should declare the role of study sponsors, if any, in the study design, in the collection, analysis and interpretation of data; in the writing of the manuscript; and in the decision to submit the manuscript for publication. If the study sponsors had no such involvement, the authors should so state.

Randomised controlled trials

All randomised controlled trials submitted for publication in IJAA should include a completed Consolidated Standards of Reporting *Trials* (CONSORT) flow chart. Please refer to the CONSORT statement website at <http://www.consort-statement.org> for more information. IJAA has adopted the proposal from the International Committee of Medical Journal Editors (ICMJE) which require, as a condition of consideration for publication of clinical trials, registration in a public trials registry. *Trials* must register at or before the onset of patient enrolment. The clinical trial registration number should be included at the end of the abstract of the article. For this purpose, a clinical trial is defined as any research project that prospectively assigns human subjects to intervention or comparison groups to study the cause-and-effect relationship between a medical intervention and a health outcome. Studies designed for other purposes, such as to study pharmacokinetics or major toxicity (e.g. phase I trials) would be exempt. Further information can be found at www.icmje.org. Revisions received later than 3 months after this request will be treated as new submissions.

Authors in Japan please note: If you would like information about how to have the English of your paper checked, corrected and improved (*before submission*), please contact our Tokyo office who will inform you of the services provided by language correctors: Elsevier Japan, 9-15 Higashi-Azabu 1-chome, Minato-ku, Tokyo, 106 Japan, Tokyo; Tel: +81-3-5561-5032; Fax: +81-3-5561-5032.

Audio Slides The journal encourages authors to create an AudioSlides presentation with their published article. AudioSlides are brief, webinar-style presentations that are shown next to the online article on ScienceDirect. This gives authors the opportunity to summarize their research in their own words and to help readers understand what the paper is about. More information and examples are available at <http://www.elsevier.com/audioslides>. Authors of this journal will automatically receive an invitation e-mail to create an AudioSlides presentation after acceptance of their paper.

Funding body agreements and policies Elsevier has established agreements and developed policies to allow authors whose articles appear in journals published by Elsevier, to comply with potential manuscript archiving requirements as specified as conditions of their grant awards. To learn more about existing agreements and policies please visit <http://www.elsevier.com/fundingbodies>

Open Access This journal offers authors two choices to publish their research;

1. Open Access • Articles are freely available to both subscribers and the wider public with permitted reuse • An Open Access publication fee is payable by authors or their research funder

2. Subscription • Articles are made available to subscribers as well as developing countries and patient groups through our access programs (<http://www.elsevier.com/access>) • No Open Access publication fee

All articles published Open Access will be immediately and permanently free for everyone to read and download. Permitted reuse is defined by your choice of one of the following Creative Commons user licenses:

Creative Commons Attribution-Non Commercial-ShareAlike (CC BY-NC-SA): for non-commercial purposes, lets others distribute and copy the article, to create extracts, abstracts and other revised versions, adaptations or derivative works of or from an article (such as a translation), to include in a collective work (such as an anthology), to text and data mine the

article, as long as they credit the author(s), do not represent the author as endorsing their adaptation of the article, do not modify the article in such a way as to damage the author's honor or reputation, and license their new adaptations or creations under identical terms (CC BY NC SA).

Creative Commons Attribution-NonCommercial-NoDerivs (CC-BY-NC-ND): for non-commercial purposes, lets others distribute and copy the article, and to include in a collective work (such as an anthology), as long as they credit the author(s) and provided they do not alter or modify the article.

Creative Commons Attribution (CC-BY): available only for authors funded by organizations with which we have established an agreement with. For a full list please see www.elsevier.com/fundingbodies

Elsevier has established agreements with funding bodies. This ensures authors can comply with funding body Open Access requirements, including specific user licenses, such as CC-BY. Some authors may also be reimbursed for associated publication fees. www.elsevier.com/fundingbodies

To provide Open Access, this journal has a publication fee which needs to be met by the authors or their research funders for each article published Open Access. Your publication choice will have no effect on the peer review process or acceptance of submitted articles.

The Open Access publication fee for this journal is \$USD 3,000, excluding taxes