

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
SISTEMA UNIVERSIDADE ABERTA DO BRASIL
CURSO LICENCIATURA EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS EaD

Camila Diedrich

Desenvolvimento de Nanoemulsão de Luteolina Revestida com Quitosana

Pato Branco

2021

Camila Diedrich

Desenvolvimento de Nanoemulsão de Luteolina Revestida com Quitosana

Trabalho de Conclusão do Curso de Graduação em Ciências Biológicas do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Santa Catarina como requisito para a obtenção do título de Licenciado em Ciências Biológicas.

Orientador: Prof. Dr. Adair Roberto Soares dos Santos

Coorientadora: Profa. Dra. Rubiana Mara Mainardes

Pato Branco

2021

Ficha de identificação da obra

Diedrich, Camila

Desenvolvimento de Nanoemulsão de Luteolina Revestida com Quitosana / Camila Diedrich ; orientador, Adair Roberto Soares dos Santos, coorientador, Rubiana Mara Mainardes, 2021.

52 p.

Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Biológicas, Graduação em Ciências Biológicas, Florianópolis, 2021.

Inclui referências.

1. Ciências Biológicas. I. Soares dos Santos, Adair Roberto . II. Mainardes, Rubiana Mara . III. Universidade Federal de Santa Catarina. Graduação em Ciências Biológicas. IV. Título.

Camila Diedrich

Desenvolvimento de Nanoemulsão de Luteolina Revestida com Quitosana

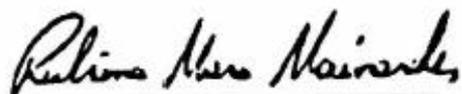
Este Trabalho Conclusão de Curso foi julgado adequado para obtenção do Título de “Licenciada em Biologia” e aprovado em sua forma final pelo Curso de Licenciatura em Ciências Biológicas

Florianópolis, 02 de julho de 2021.

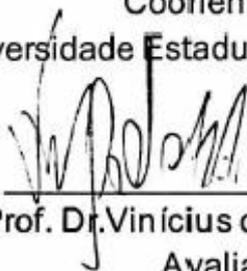
Profa. Dra. Viviane Mara Woehl
Coordenador do Curso

Banca Examinadora:

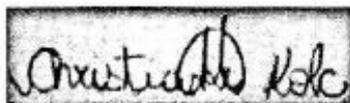
Prof. Dr. Adair Roberto Soares dos Santos
Orientador
Universidade Federal de Santa Catarina



Profa. Dra. Rubiana Mara Mainardes
Coorientadora
Universidade Estadual do Centro-Oeste



Prof. Dr. Vinícius de Maria Gadotti
Avaliador
University of Calgary



Profa. Dra. Christiane Schneider Machado
Avaliadora
Universidade Estadual do Centro-Oeste

A dedicação e o amor pela carreira acadêmica são muito importantes para o desenvolvimento pessoal e profissional de cada graduando.

Por isso, dedico esta monografia com muito carinho ao professor Dr. Adair Roberto Soares dos Santos, que aceitou orientar este trabalho e me recebeu muito bem entre seus orientados, mesmo que a distância.

Infelizmente, a vida nos surpreende com partidas repentinas para as quais não estamos preparados.

Descanse em paz, professor, seu legado ficará registrado e será perpetuado por todos nós.

AGRADECIMENTOS

Ao meu marido Cleber Silvano Schauss, por toda a dedicação, incentivo e paciência durante todos esses anos e por acreditar em mim e estar sempre disposto a fazer um cafezinho.

Aos meus pais Marcos e Marli e meus irmãos Marcos Junior e Ana Carolina, pelo incentivo e compreensão pela minha ausência.

Aos meus sogros Darcy e Beatriz, pelo incentivo e pela ajuda nas coletas de insetos, plantas e confecção de materiais durante esses anos.

Ao professor Dr. Adair Roberto Soares dos Santos pela dedicação na orientação deste trabalho.

À professora Dra. Rubiana Mara Mainardes pela coorientação neste trabalho e orientação de doutorado, pela amizade e por confiar no meu potencial.

À minha amiga e filha científica Isabella Camargo Zittlau, pelo companheirismo, dedicação e toda a ajuda na obtenção e caracterização das nanoemulsões.

Aos colegas do Laboratório de Nanotecnologia Farmacêutica da UNICENTRO, especialmente à Juliane, Chris Kolc, Chris Rampim (*in memoriam*), Margani, Rossana, Natália, pela parceira nos cafés e discussões sobre formulações.

Aos colegas do grupo “Sobreviventes da Bio”, Luis, Gabi, Thais, Ezi, Fernanda, Jaque pela amizade e parceria durante os anos de graduação, em especial à Raquel que de professora na graduação e mestrado tornou-se amiga, por me incentivar a continuar a graduação depois que passei no doutorado.

Aos professores do Curso de Licenciatura em Ciências Biológicas, pelos ensinamentos, dedicação e por se deslocarem até Pato Branco quando possível.

Ao Polo Pato Branco da Universidade Aberta do Brasil, Cássia e Tutores Celso e Diego pela disponibilidade.

À CAPES pelo incentivo financeiro e bolsa de pesquisa durante o mestrado e doutorado, que me permitiram dedicar tempo a uma segunda graduação.

Aos amigos que a vida trouxe e que fizeram minha caminhada mais alegre e a todos que de alguma forma contribuíram para a realização dessa pesquisa.

Muito Obrigada!

“Let us pick up our books and our pens,” I said. “They are our most powerful weapons. One child, one teacher, one book and one pen can change the world.”

Malala Yousafzai

“No government has the right to decide on the truth of scientific principles, nor to prescribe in any way the character of the questions investigated. Neither may a government determine the aesthetic value of artistic creations, nor limit the forms of literacy or artistic expression. Nor should it pronounce on the validity of economic, historic, religious, or philosophical doctrines. Instead, it has a duty to its citizens to maintain the freedom, to let those citizens contribute to the further adventure and the development of the human race.”

Richard P. Feynman

RESUMO

A Luteolina é um flavonoide que vem apresentando diversas atividades biológicas, porém sua baixa solubilidade em água afeta a biodistribuição do fármaco no organismo. Neste trabalho, uma nanoemulsão contendo luteolina e revestida com quitosana foi obtida como meio de melhorar as características físico-químicas do fármaco. O produto obtido apresentou diâmetro médio de 67,5 nm, índice de polidispersão 0,174 e carga superficial de 9,09 mV, além de apresentar estabilidade cinética e de armazenamento por 90 dias. Os resultados indicam que o método de cavitação por sonicador bem como os surfactantes empregados foram eficientes na produção de nanoemulsão e exibem características que justificam a continuidade dos testes de caracterização e análises *in vitro* do produto.

Palavras-chave: Cavitação, caracterização de nanoemulsões, revestimento com quitosana.

ABSTRACT

Luteolin is a flavonoid that presents several biological activities, but its low water solubility affects the biodistribution of the drug in the body. In this work, a nanoemulsion containing luteolin and coated with chitosan was obtained as a means of improving the physical and chemical characteristics of the drug. The nanoemulsion presented an average diameter of 67.5 nm, a polydispersity index of 0.174 and a surface charge of 9.09 mV, in addition to having kinetic and storage stability for 90 days. The results indicate that the cavitation method as well as the surfactants employed in the formulation were efficient in the production of nanoemulsion and exhibit characteristics that justify the continuation of the characterization tests and in vitro analyzes of the product.

Keywords: Cavitation, characterization of nanoemulsions, chitosan coating.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Estrutura molecular de flavonoide e da luteolina.	8
Figura 2 – Escala de dimensões de compostos nanoestruturados comparados a outros materiais.....	10
Figura 3 - Nanoestruturas comumente utilizadas na entrega de fármacos.	11
Figura 4 - Estrutura de nanoemulsão do tipo óleo em água (A), água em óleo (B) e estrutura de um surfactante (C).....	13
Figura 5 - Estrutura e componente de nanoemulsão do tipo óleo em água.	14
Figura 6 - Estrutura química molecular do ácido oleico.....	15
Figura 7 - Estrutura química molecular do Tween 20.....	16
Figura 8 - Estrutura química molecular do etilenoglicol.....	16
Figura 9 - Ilustração do processo de cavitação por sonicador.	17
Figura 10 - Estrutura química molecular da quitosana.....	18
Figura 11 – Aspecto da nanoemulsão carregada com LUT (A) e branca (B).	26
Figura 12 – Carga superficial (mV) das nanoemulsões de luteolina sem quitosana (A) e com quitosana (B).	29
Figura 13 – Diâmetro médio (A) e carga superficial (B) da nanoemulsão contendo luteolina e revestida com quitosana após teste de estabilidade cinética.....	31
Figura 14 – Estabilidade do diâmetro médio e carga superficial da nanoemulsão armazenada a temperatura ambiente e de refrigeração por 90 dias.....	32

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Estudos encontrados na literatura demonstrando algumas atividades biológicas da luteolina na forma livre.	8
Tabela 2 - Trabalhos publicados com resultados de testes <i>in vivo</i> e <i>in vitro</i> com luteolina na forma nanoestruturada.	19
Tabela 3 – Equilíbrio hidrofílico-lipofílico obtido com a mistura dos surfactantes utilizados na produção de nanoemulsão contendo LUT.....	22
Tabela 4 – Diâmetro médio, índice de polidispersão e carga superficial das formulações de NECh-LUT, NECh-Br e NE-LUT.	28
Tabela 5 – Estabilidade cinética e de armazenamento a temperatura ambiente e de refrigeração da nanoemulsão contendo luteolina revestida com quitosana.	30

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	5
2	OBJETIVOS	6
2.1	OBJETIVO GERAL.....	6
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	6
3	REFERENCIAL TEÓRICO.....	7
3.1	FLAVONOIDES E LUTEOLINA.....	7
3.2	NANOTECNOLOGIA FARMACÊUTICA	9
3.3	NANOEMULSÃO.....	12
3.4	MÉTODOS DE OBTENÇÃO DE NANOEMULSÃO.....	16
3.5	POTENCIAL DE APLICAÇÃO DE COMPOSTOS NANOESTRUTURADOS CONTENDO LUTEOLINA	18
3.6	IMPORTÂNCIA DAS PROPRIEDADES DE TAMANHO, CARGA SUPERFICIAL E ESTABILIDADE DE NANOEMULSÕES.....	20
4	MATERIAIS E MÉTODOS	22
4.1	OBTENÇÃO DA NANOEMULSÃO CONTENDO LUTEOLINA	22
4.2	DIÂMETRO MÉDIO E ÍNDICE DE POLIDISPERSÃO	22
4.3	CARGA SUPERFICIAL	23
4.4	ESTABILIDADE DA NANOEMULSÃO	23
4.5	TRATAMENTO ESTATÍSTICO	23
5	RESULTADOS E DISCUSSÕES	25
5.1	OBTENÇÃO DA NANOEMULSÃO CONTENDO LUTEOLINA	25
5.2	CARACTERIZAÇÃO DAS FORMULAÇÕES DE NANOEMULSÃO.....	27
5.3	ESTABILIDADE DA NECH-LUT.....	30
6	CONCLUSÃO	34
	REFERÊNCIAS.....	35

1 INTRODUÇÃO

A Luteolina (LUT) é um flavonoide encontrado em vegetais ao qual diversas propriedades biológicas são atribuídas, tais como antioxidante, antitumoral, entre outras (GANZERA; MURAUER, 2017). Contudo a baixa solubilidade em água apresentada pela luteolina diminui sua disponibilidade e dificulta sua administração na forma livre (HINDARTO *et al.*, 2017). Desta forma o uso da nanotecnologia farmacêutica para melhorar as características farmacotécnicas da luteolina surge como uma solução viável na aplicação da LUT frente a diversas doenças.

Entre as formas de nanoestruturas viáveis na entrega de luteolina ao organismo estão as nanoemulsões. O uso de nanoemulsões para encapsulamento de fármacos hidrofóbicos apresenta vantagens como biocompatibilidade, biodegradabilidade e estabilidade, além do aumento na solubilidade e disponibilidade do fármaco, liberação controlada e diminuição dos efeitos colaterais associados a droga (SHEGOKAR *et al.*, 2017).

No desenvolvimento de nanoemulsões, fatores como óleo e surfactantes empregados bem como o método de obtenção são definitivos nas propriedades do sistema obtido (CHATTERJEE *et al.*, 2019). As características tamanho e uniformidade das partículas, carga superficial e estabilidade influenciam diretamente na eficiência bioativa da nanoemulsão. Partículas muito grandes não são absorvidas pelo organismo na forma almejada, enquanto partículas muito pequenas são facilmente excretadas pelo organismo (KUMAR *et al.*, 2008). A carga superficial das nanopartículas interfere na interação das mesmas com as membranas biológicas, além de influenciar na agregação das partículas e a estabilidade do sistema (ABDOU *et al.*, 2017).

Este trabalho teve como objetivo a formulação de nanoemulsão contendo luteolina e análise das suas propriedades de tamanho, índice de polidispersão, estabilidade, visando seu potencial farmacológico na forma nanoestruturada.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Desenvolver e caracterizar nanoemulsão contendo luteolina e revestidas com quitosana e verificar suas características físico-químicas e de estabilidade.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Obter nanoemulsão contendo luteolina;
- Revestir a nanoemulsão obtida com quitosana;
- Caracterizar a nanoemulsão quanto ao tamanho das partículas e índice de polidispersão;
- Determinar a carga superficial das partículas de nanoemulsão;
- Diferenciar as formulações de nanoemulsão quanto às características físico-químicas;
- Verificar a estabilidade cinética e de armazenamento da nanoemulsão.

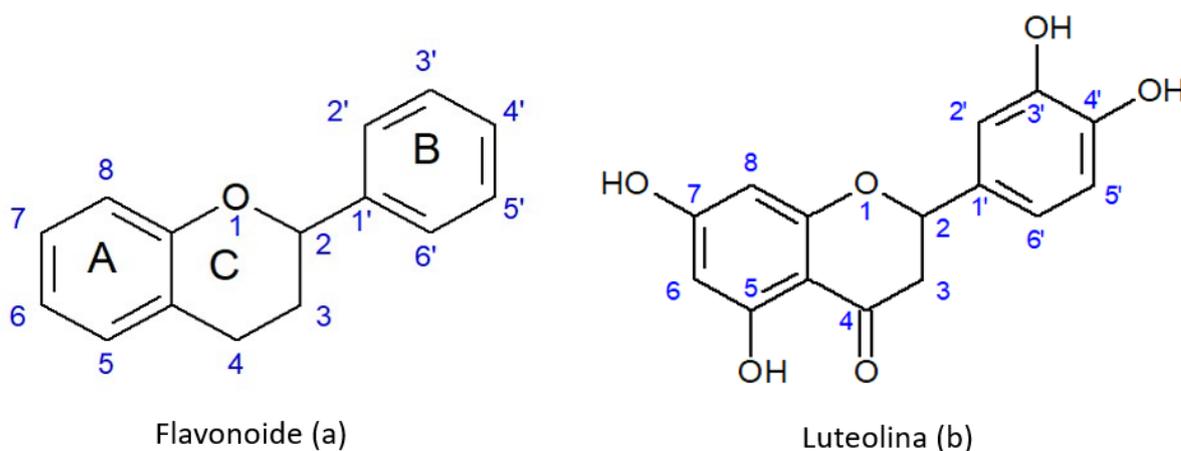
3 REFERENCIAL TEÓRICO

3.1 FLAVONOIDES E LUTEOLINA

Flavonoides, compostos fenólicos oriundos do metabolismo secundário de plantas, são encontrados em frutas e vegetais (JAFARI, 2017a) e são reconhecidos por inúmeras atividades farmacológicas (GANZERA; MURAUER, 2017). A estrutura química dos flavonoides contém 15 carbonos, divididos em dois anéis aromáticos unidos por 3 carbonos, C6-C3-C6 (KUPPUSAMY *et al.*, 2018) (Figura 1a). Os flavonoides são divididos em subclasses de acordo com os ligantes encontrados na estrutura principal (DURGA; NATHIYA; DEVASENA, 2014), das quais suas atividades bioativas são dependentes (AMBIGAIPALAN, 2015). Entre as atividades descritas dos mais de 600 flavonoides identificados na natureza estão antioxidante, antitumoral, anti-isquêmica, anti-inflamatória (AMBIGAIPALAN, 2015), antidiabética, neuroprotetora (CHAUDHARY, 2006; SPAGNUOLO; MOCCIA; RUSSO, 2017), entre outras.

A luteolina (5,7,3',4'-tetrahidroxiflavona) é um flavonoide da classe das flavonas abundante em plantas como aipo, salsa, pimenta verde, chá de camomila (SPAGNUOLO; MOCCIA; RUSSO, 2017), casca de frutas (BAKHTIARI *et al.*, 2017), cenoura, pimenta, orégano, alface, brotos de trigo sarraceno, nabo, pepino, óleo de oliva, menta, tomilho, alcaparras, alecrim e romã (NABAVI *et al.*, 2015). Sua fórmula é composta pela estrutura C6-C3-C6 de flavonoide, adicionada de dupla ligação entre os carbonos 2 e 3 e um grupo cetona no carbono 4, além de hidroxilas nos carbonos 5, 7, 3' e 4' (NASO *et al.*, 2016), conforme mostra a Figura 1b.

Figura 1 - Estrutura molecular de flavonoide e da luteolina.



Fonte: Elaborada utilizando software ChemSketch®.

Estudos desenvolvidos com Luteolina vêm demonstrando seu potencial neuroprotetor (HARA *et al.*, 2014; LI *et al.*, 2015), antinociceptiva (HASHEMZAEI *et al.*, 2017), antioxidante (BUSTOS *et al.*, 2018), antimicrobiana (TÖRMÄKANGAS *et al.*, 2005), antiviral (PENG *et al.*, 2017) e antitumoral. Na Tabela 1 estão listados estudos desenvolvidos com luteolina na sua forma livre.

Tabela 1 - Estudos encontrados na literatura demonstrando algumas atividades biológicas da luteolina na forma livre.

Atividade	Referência
Dor neuropática	(HARA <i>et al.</i> , 2014)
Antioxidante <i>in vivo</i>	(BUSTOS <i>et al.</i> , 2018)
Antimicrobiana <i>in vitro</i> (<i>S. aureus</i> ; <i>E. coli.</i>)	
Antitumoral <i>in vitro</i> (glioblastoma)	(CHAKRABARTI; RAY, 2015; CHENG <i>et al.</i> , 2013)
Antidiabética	(WANG <i>et al.</i> , 2011)
Antimicrobiana <i>in vivo</i> (<i>Chlamydia pneumoniae</i>)	(TÖRMÄKANGAS <i>et al.</i> , 2005)
Antitumoral <i>in vivo</i> (pulmão)	(KASALA <i>et al.</i> , 2016)
Antitumoral <i>in vitro</i> (mama)	(SUI; XIE; XIE, 2016)
Antitumoral <i>in vitro</i> (fígado)	(MICHELS <i>et al.</i> , 2005)

Anti-inflamatória, antioxidante e neuroprotetora	(DIRSCHERL <i>et al.</i> , 2010; GADOTTI <i>et al.</i> , 2019)
Antitumoral <i>in vivo</i> (mama)	(LEE; OH; SUNG, 2012)
Antitumoral <i>in vitro</i> (colorretal e cervical)	(SHI; ONG; SHEN, 2004)
Antiasmática <i>in vivo</i>	(KIM <i>et al.</i> , 2018)
Neuropatia diabética	(LI <i>et al.</i> , 2015)
Antinociceptiva	(HASHEMZAEI <i>et al.</i> , 2017)
Antiviral <i>in vivo</i> (dengue)	(PENG <i>et al.</i> , 2017)
Ansiolítica	(GADOTTI; ZAMPONI, 2019)

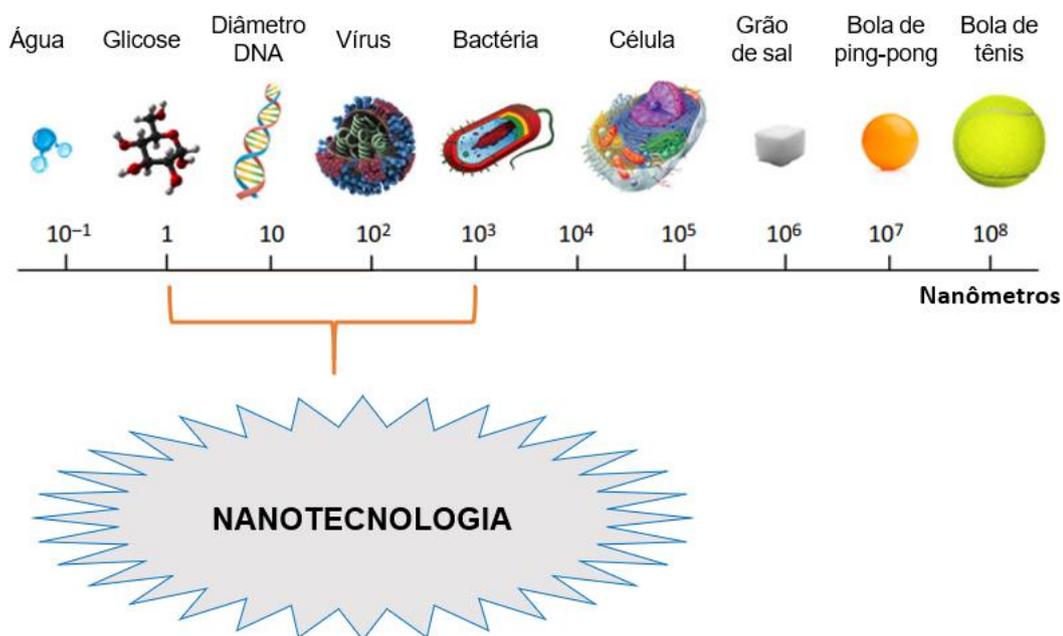
Embora as atividades farmacológicas da luteolina venham sendo reconhecidas em diversos trabalhos, sua baixa solubilidade em água leva a limitações farmacêuticas do seu emprego na forma livre. A característica altamente hidrofóbica da luteolina dificulta sua absorção pelo organismo e diminui sua biodisponibilidade (HINDARTO *et al.*, 2017). De acordo com De Oliveira; Bastos, (2011), para que o mecanismo de ação de compostos bioativos seja exercida, faz-se necessário que os mesmos estejam presentes no organismo em concentrações mínimas que geralmente são diminuídas pelo próprio mecanismo de defasa do metabolismo. No desenvolvimento de novas estruturas de fármacos, a indústria farmacêutica vem procurando meios de melhorar as características de fármacos insolúveis em água, os quais tem também baixa absorção e biodisponibilidade insuficiente no organismo. Desta forma, a nanoencapsulação de flavonoides permite o aumento da solubilidade em água, biodisponibilidade e superfície de contato, melhorando a absorção e permeação destas substâncias pelo organismo (JAFARI, 2017b).

3.2 NANOTECNOLOGIA FARMACÊUTICA

Nanotecnologia é o estudo e desenvolvimento de materiais em nanoescala (10^{-9} m) (CHAUDHARY, 2006). A nanotecnologia utiliza das áreas de química, física e

outras disciplinas, criando um campo multidisciplinar de aplicação (ÇETIN *et al.*, 2017). A palavra “nano” (*vávoç, nánnos*) tem origem grega, que significa “anão” e compreende materiais na faixa entre 1 e 1000 nanômetros (nm) (SAHANI; SHARMA, 2021), sendo que 1 nm corresponde a uma bilionésima parte de um metro (10^{-9}) (SINGH; KUMARI; KUMAR, 2017). A Figura 2 mostra a dimensão de alguns materiais e substâncias em comparação a escala nanométrica.

Figura 2 – Escala de dimensões de compostos nanoestruturados comparados a outros materiais.



Fonte: Adaptado de Wong *et al.*, (2017).

Apesar de que a ideia de nanotecnologia tenha sido construída primeiramente por Richard Feynman em seu livro “There’s Plenty of Room at the Bottom” (“Há muito espaço no fundo”) em 1959, somente em 1975 a palavra nanotecnologia foi estabelecida pelo japonês Norio Taniguchi (BHOJ *et al.*, 2021).

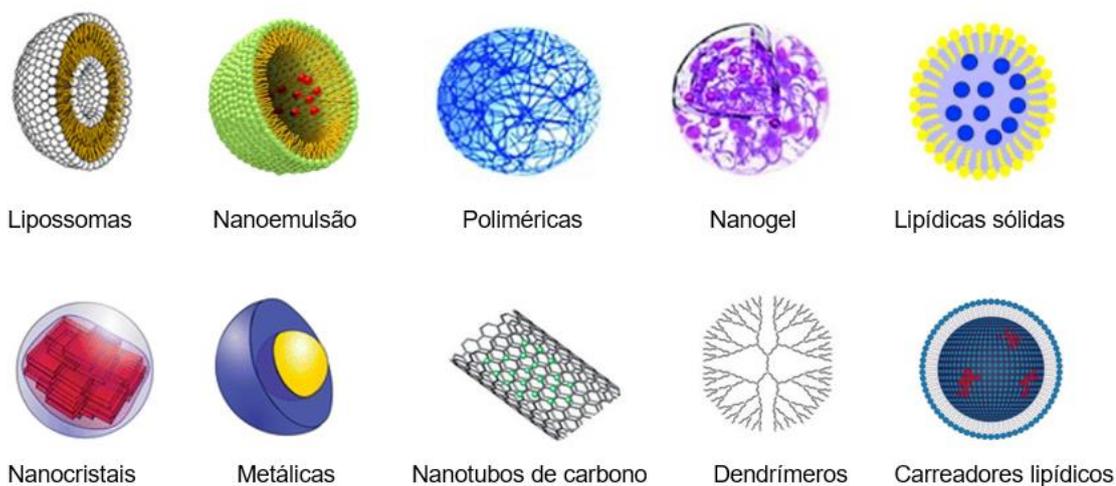
A Nanomedicina compreende estudos de tratamento, diagnóstico e monitoramento de doenças via uso de nanotecnologia (OSTRÓŽKA-CIEŚLIK; SARECKA-HUJAR, 2017). Mais especificamente, a Nanotecnologia Farmacêutica consiste na aplicação da nanotecnologia no campo da farmácia, oferecendo soluções inovadoras para o diagnóstico, tratamento e profilaxia de doenças através do desenvolvimento e modificação de fármacos para nanoescala (HOLBAN, 2018). O uso

da nanotecnologia permite o preparo de fármacos nanoestruturados com as características funcionais necessárias, através da aplicação das propriedades de diferentes materiais (SEMENOVA; TARASOV; GOODILIN, 2019).

Compostos desenvolvidos na forma de nanopartículas apresentam-se como uma alternativa a forma livre de medicamentos e já foram aprovados por autoridades de saúde como *Food and Drug Administration* (FDA), agência americana responsável pelo controle de fármacos e alimentos (GROSSEN *et al.*, 2017). Entre as vantagens do uso de nanopartículas na entrega de fármacos estão o aumento na superfície de contato e biodisponibilidade, baixa toxicidade a células normais e maior toxicidade frente as células tumorais (TAGHIPOUR *et al.*, 2017), diminuição dos efeitos colaterais, liberação controlada do fármaco e proteção contra degradação enzimática (ÇETIN *et al.*, 2017). Essas características tornam os tratamentos de doenças tumorais, degenerativas e de origem inflamatória e infecciosa, mais eficientes e mais confortáveis aos pacientes.

Entre os tipos de carreadores nanoestruturados para a entrega de fármacos estão os lipossomas, nanoemulsões, nanogéis, nanocristais, nanotubos de carbono, dendrímeros, carreadores lipídicos nanoestruturados, nanopartículas lipídicas sólidas, poliméricas, proteicas e metálicas. A Figura 3 ilustra a estrutura de alguns tipos de nanopartículas comumente utilizados no carregamento de fármacos.

Figura 3 - Nanoestruturas comumente utilizadas na entrega de fármacos.



Fonte: Adaptado de Afornali; Lorencini (2016); Ageitos; Chuah; Numata (2016); Wong *et al.* (2017) e Yaqoob *et al.* (2020).

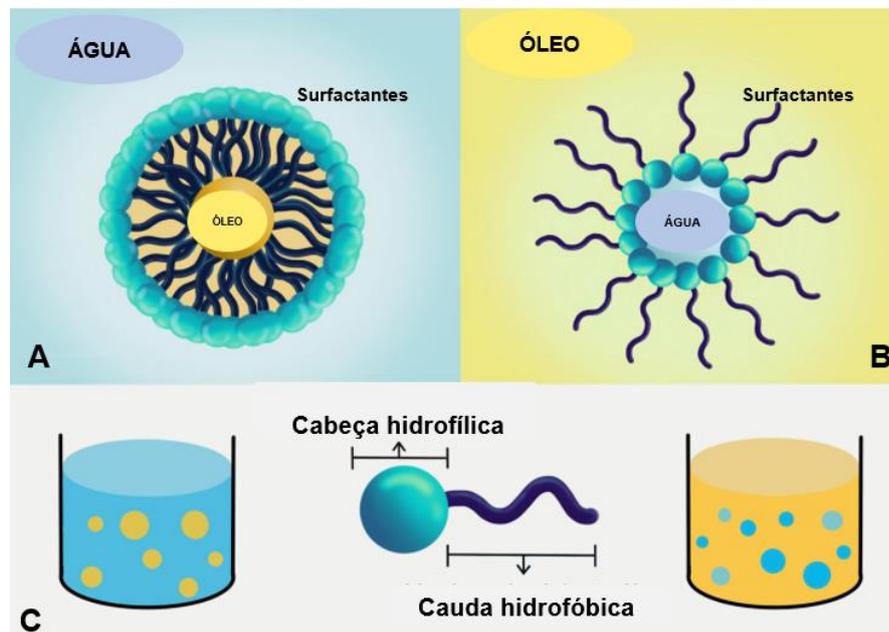
3.3 NANOEMULSÃO

Os sistemas nanoestruturados de lipídios apresentam-se como uma alternativa na melhoria das características dos fármacos devido ao aumento na solubilidade e biodisponibilidade, capacidade de funcionalização da superfície, não requerem o uso de solventes (SHEGOKAR *et al.*, 2017), permitem a liberação controlada, diminuição dos efeitos colaterais e aumentam a estabilidade do fármaco (DING; JIANG; LIU, 2018). Os lipídios formam as principais estruturas do organismo, como as membranas biológicas e, por este motivo são biodegradáveis, biocompatíveis e não tóxicos (SIRAM *et al.*, 2019). Entre os principais sistemas nanoestruturados formados por lipídios estão lipossomas, nanopartículas lipídicas sólidas e emulsões (JAFARI, 2017a).

Uma emulsão é caracterizada como um sistema heterogêneo de dois líquidos imiscíveis, um disperso no outro, os quais são mantidos nessa estrutura por meio de um agente surfactante, como mostra a Figura 4C. De acordo com o tamanho, as emulsões podem ser classificadas em macro, micro e nanoemulsão (KAUR, 2016; SIRAM *et al.*, 2019). As nanoemulsões apresentam tamanhos menores de 200 nm e possuem estabilidade térmica e cinética (PATEL; PATEL; THAKORE, 2018).

De acordo com o perfil do fármaco a ser encapsulado, pode-se empregar nanoemulsões do tipo óleo em água e água em óleo (CHATTERJEE *et al.*, 2019). A emulsão óleo em água é obtida com o óleo em menor quantidade, disperso na fase aquosa, em maior quantidade, conforme mostra a Figura 4A. Na emulsão de água em óleo a fase aquosa apresenta-se em menor quantidade, sendo esta dispersa no óleo, como mostra a Figura 4B (DEEN; SKOVGAARD; PEDERSEN, 2016).

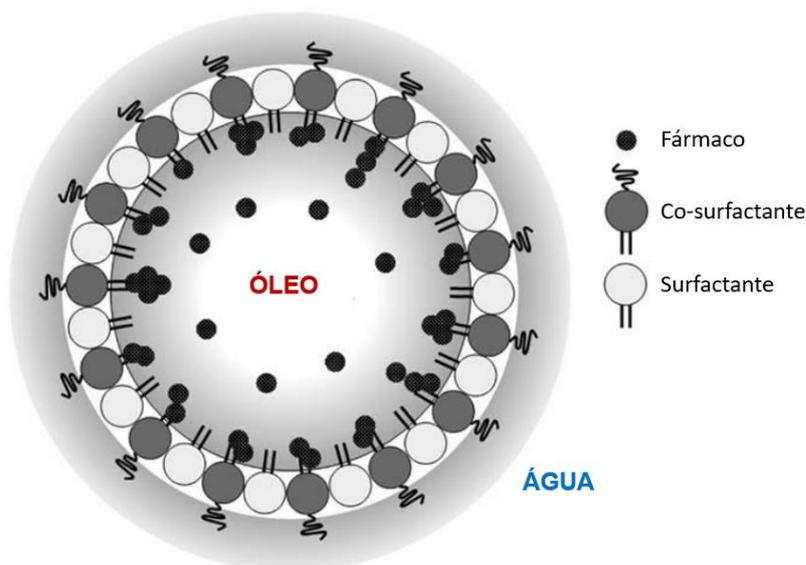
Figura 4 - Estrutura de nanoemulsão do tipo óleo em água (A), água em óleo (B) e estrutura de um surfactante (C).



Fonte: Adaptado de Ashaolu (2021).

Considerando que a maioria dos compostos com potencial farmacológico são hidrofóbicos, ou seja, têm baixa solubilidade em água as nanoemulsões do tipo óleo em água são predominantemente encontradas, no intuito de aumentar a solubilidade desses compostos (PATEL; PATEL; THAKORE, 2018). A Figura 5 retrata a estrutura de nanoemulsões do tipo óleo em água.

Figura 5 - Estrutura e componente de nanoemulsão do tipo óleo em água.

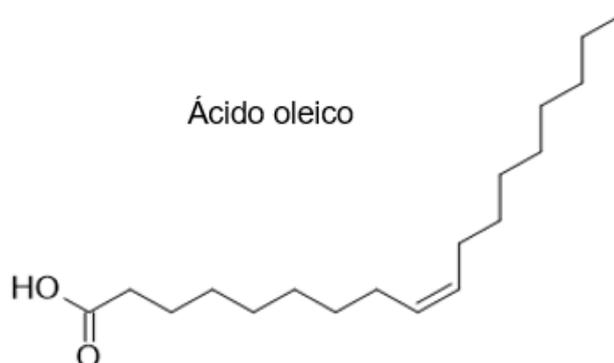


Fonte: Adaptado de Onodera *et al.* (2015).

As propriedades da nanoemulsão obtida dependem do processo de obtenção das mesmas, bem como do perfil dos componentes utilizados (SHAH; ULLAH; IMRAN, 2017). No processo de obtenção de nanoemulsão do tipo óleo em água deve-se considerar a toxicidade dos componentes utilizados e a solubilidade do fármaco no óleo, surfactante e co-surfactante (DING; JIANG; LIU, 2018).

O óleo utilizado no preparo de nanoemulsão tem a função de solubilizar o fármaco (WANI *et al.*, 2018). Óleos de cadeia média e longa, saturados e insaturados são utilizados para a formação de nanoemulsão (CHAVDA; SHAH, 2017). Cada óleo apresenta características únicas, como ponto de fusão, solubilidade e Equilíbrio Hidrofílico-Lipofílico (EHL) (SIRAM *et al.*, 2019). Um fator importante na escolha do óleo utilizado na nanoemulsão é a solubilidade do fármaco no mesmo, de modo que quanto maior a quantidade de fármaco solubilizada no óleo, menor a quantidade de óleo necessária na emulsão, evitando o aumento de surfactante no sistema (BONFERONI *et al.*, 2019). O ácido oleico é um ácido graxo insaturado com 18 átomos de carbono com uma insaturação *cis* no carbono 9 (SIRAM *et al.*, 2019) (Figura 6) e vem sendo frequentemente utilizado em nanoemulsões com fins farmacêuticos (CHATTERJEE *et al.*, 2019) devido as suas capacidades de penetração e baixa viscosidade, além de ser aprovado pelo FDA (PÉREZ-GONZÁLEZ *et al.*, 2020; SRAVANTHI *et al.*, 2015)

Figura 6 - Estrutura química molecular do ácido oleico.



Fonte: Elaborada utilizando software ChemSketch®.

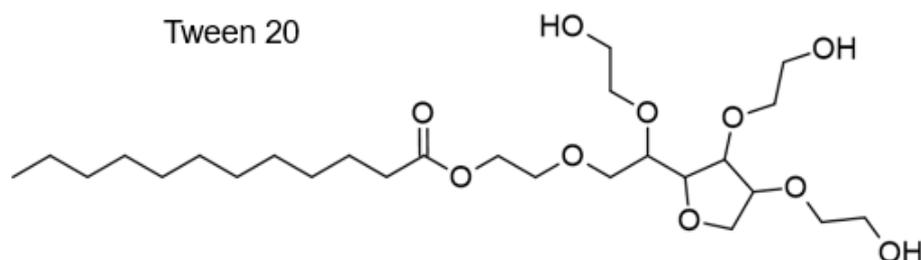
A tensão superficial entre as fases aquosa e oleosa mantém os dois líquidos imiscíveis. Agentes surfactantes e co-surfactantes são essenciais na formação de nanoemulsões, pois diminuem a tensão superficial entre as fases, permitindo a formação da emulsão (CHAVDA; SHAH, 2017), conforme mostra a Figura 5.

Para determinar o surfactante e/ou mistura de surfactante e co-surfactante, utiliza-se o valor do EHL, que são essenciais no estudo da formulação de nanoemulsão (HARWANSI; DESHMUKH; RAHMAN, 2019). O EHL consiste em uma escala semiempírica desenvolvida por William C. Griffin, em 1949, que determinou experimentalmente os valores de EHL para surfactantes e o EHL requerido de óleos (PASQUALI; SACCO; BREGNI, 2009). A partir dos valores de EHL é possível desenvolver emulsões empregando os valores de EHL dos surfactantes e relacioná-los com o EHL requerido do óleo utilizado.

Dessa forma surfactantes com EHL entre 8 e 18 são utilizados na preparação de emulsões óleo em água, enquanto os surfactantes com EHL entre 3 e 6 são empregados na obtenção de emulsões água em óleo (SHAH; IMRAN; ULLAH, 2017). O surfactante não iônico Tween 20 vem sendo largamente utilizado devido a sua eficiência na estabilização de superfícies de nanoemulsões, através da diminuição da tensão superficial. O Tween 20 (ou Polissorbato 20) consiste em um éster de polioxietileno com cauda de 12 carbonos saturados, que conferem propriedades anfífilas à molécula que interage com ambas as partes oleosa e aquosa das nanoemulsões (ARTIGA-ARTIGAS; LANJARI-PÉREZ; MARTÍN-BELLOSO, 2018).

Ainda, o Polissorbato 20 foi reconhecido como aditivo de alimentos desde a década de 60 (KAUR; MEHTA, 2017) o que assegura seu uso como surfactante de nanoemulsões com fins farmacêuticos.

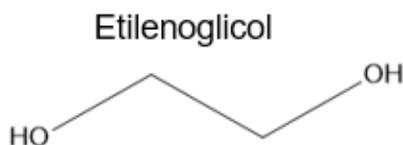
Figura 7 - Estrutura química molecular do Tween 20.



Fonte: Elaborada utilizando software ChemSketch®.

Ainda, o uso de co-surfactantes permite a manipulação do EHL dos surfactantes, modificando as características da emulsão de acordo com as propriedades almejadas (ABDOU *et al.*, 2017). Derivados de álcoois de cadeia média e curta são tidos como bons co-surfactantes (CHAVDA; SHAH, 2017; SHAH; ULLAH; IMRAN, 2017). O etilenoglicol é utilizado como surfactante devido a sua solubilidade em água e auxílio na solubilidade de fármacos hidrofóbicos.

Figura 8 - Estrutura química molecular do etilenoglicol.



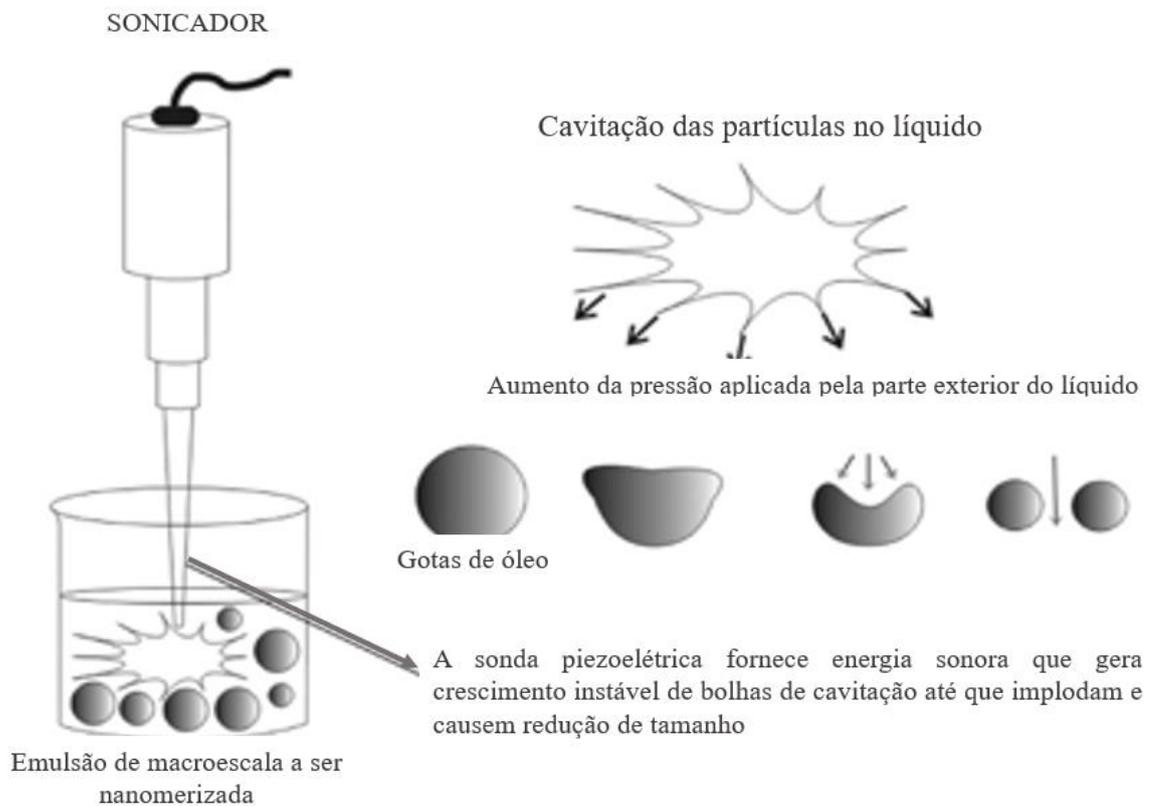
Fonte: Elaborada utilizando software ChemSketch®.

3.4 MÉTODOS DE OBTENÇÃO DE NANOEMULSÃO

Na obtenção de nanoemulsões são utilizadas metodologias de baixa e alta energia, assim como a combinação das mesmas (SHAH; IMRAN; ULLAH, 2017). Entre os métodos de baixa energia estão o método de fase por inversão de

temperatura, método de fase por inversão de concentração, método de inversão do ponto de emulsão e a emulsificação espontânea (PUND; JOSHI; PATRAVALE, 2016). Os principais métodos de alta energia aplicados na obtenção de nanoemulsão utilizam homogeneizadores de alta pressão e sonicadores. Na sonicação, a emulsão obtida pelos métodos de baixa energia são expostos a ondas sonoras de alta frequência, que causam o colapso das cavidades do líquido, processo denominado cavitação, que diminui o tamanho das partículas formadas (PATEL *et al.*, 2017). A Figura 9 demonstra o funcionamento do processo de cavitação em sonicador.

Figura 9 - Ilustração do processo de cavitação por sonicador.

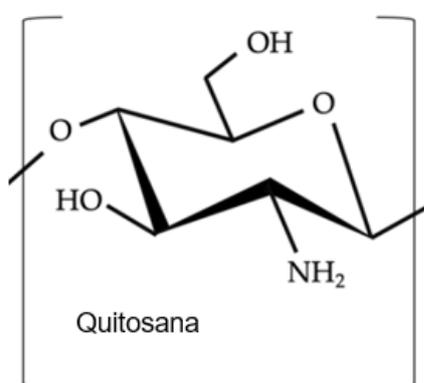


Fonte: Adaptado de Singh; Kumari; Kumar (2017).

Na emulsão do tipo óleo em água a água está presente em maior quantidade na parte externa da estrutura. Dessa forma, a fase aquosa pode ser adicionada de compostos que modifiquem sua estrutura e/ou carga superficial (KAUR, 2016). Compostos com características catiônicas, tais como a quitosana podem ser utilizados como fase aquosa, permitindo o aumento da carga superficial da nanoemulsão, aumentando sua capacidade de adesão às membranas biológicas (CHATTERJEE *et*

al., 2019; CHIRCOV; GRUMEZESCU, 2019). A quitosana é um polissacarídeo biodegradável linear composta de D-glucosamina em configuração β -(1-4) e grupos amino, conforme mostra a Figura 10. Entre as características apresentadas pelo revestimento de nanoemulsões com quitosana estão biocompatibilidade, biodegradabilidade, liberação controlada e propriedades mucoadesivas (YU *et al.*, 2019).

Figura 10 - Estrutura química molecular da quitosana



Fonte: Adaptado de Jiménez-Ocampo *et al.* (2019).

3.5 POTENCIAL DE APLICAÇÃO DE COMPOSTOS NANOESTRUTURADOS CONTENDO LUTEOLINA

O desenvolvimento de sistemas nanoestruturados de luteolina apresenta-se como uma alternativa de melhora nas características do fármaco. Formulações nanoestruturadas de luteolina vêm sendo desenvolvidas na busca de alternativas viáveis no tratamento de câncer, doenças degenerativas, infecções e inflamações (JEONG; HA; PARK, 2016; TAN *et al.*, 2018; WANG *et al.*, 2019; ZHENG *et al.*, 2017). A Tabela 2 dispõe exemplos de atividades bioativas verificadas da luteolina nanoestruturada encontrados na literatura.

Tabela 2 - Trabalhos publicados com resultados de testes *in vivo* e *in vitro* com luteolina na forma nanoestruturada.

Tipo	Atividade	Referência
Lipossoma	Antitumoral <i>in vitro</i> (colorretal)	(WU <i>et al.</i> , 2018)
Fitossoma	Antitumoral <i>in vitro</i> (mama)	(SABZICHI <i>et al.</i> , 2014)
Lipossoma	Antitumoral <i>in vivo</i> (pulmão)	(LIA <i>et al.</i> , 2016)
Nanomicelas	Anti-isquêmica <i>in vitro</i>	(TAN <i>et al.</i> , 2018)
Nanopartículas proteicas	Antitumoral <i>in vitro</i> (cólon)	(SHINDE <i>et al.</i> , 2019)
Nanopartículas de prata	Antitumoral <i>in vitro</i> (neuroblastoma) Antimicrobiana <i>in vitro</i> (<i>S. aureus</i> ; <i>E. coli.</i>)	(QING <i>et al.</i> , 2017)
Nanopartículas poliméricas	Antitumoral <i>in vitro</i> (cabeça e pescoço; pulmão) Antitumoral <i>in vivo</i> (cabeça e pescoço)	(MAJUMDAR <i>et al.</i> , 2014)
Nanocarreador quilomícron	Antitumoral <i>in vivo</i> (fígado)	(ELNAGGAR; ELSHEIKH; ABDALLAH, 2018)
Nanopartículas lipídicas sólidas	Antioxidante <i>in vitro</i>	(JEONG; HA; PARK, 2016)
Lipossoma	atividade anti-isquêmica	(ZHAO <i>et al.</i> , 2011)
Nanomicelas poliméricas	Antitumoral <i>in vivo</i> (glioma)	(ZHENG <i>et al.</i> , 2017)

Zheng *et al.* (2017) estudou o efeito do tratamento intravenoso com nanomicelas de luteolina em modelo subcutâneo em ratos, alcançando redução de 78% no volume de gliomas. Majumdar *et al.* (2014) desenvolveu nanopartículas poliméricas contendo luteolina para tratar, via intraperitoneal, ratos com câncer de cabeça e pescoço desenvolvido por injeção subcutânea, obtendo diferença

significativa no volume de tumor entre os grupos tratados com luteolina livre e com a droga nanoencapsulada.

No tratamento de isquemias, a LUT mostrou atividade neuroprotetora em tecidos atingidos, bem como redução das sequelas causadas pelo processo oxidativo e atividades inflamatórias gerados (AZIZ; KIM; YOUL, 2018). Zhao *et al.* (2011) estudou o efeito de lipossomas de luteolina em modelo de isquemia-reperfusão em ratos, verificando a atividade anti-isquêmica do composto na forma nanoestruturada. Da mesma forma, Tan *et al.* (2018) testou a atividade de reparação de nanomicelas de luteolina após indução de isquemia cerebral, demonstrando maior atividade das nanomicelas comparadas ao composto na forma livre. Ainda, a atividade antioxidante de nanopartículas de luteolina foi provada por Wang *et al.* (2019) em modelo de peroxidação lipídica em fígados de ratos.

3.6 IMPORTÂNCIA DAS PROPRIEDADES DE TAMANHO, CARGA SUPERFICIAL E ESTABILIDADE DE NANOEMULSÕES

Nanoemulsões são utilizadas na entrega de fármacos para tratamentos de diversas doenças devido a sua alta capacidade de penetração e transporte transcelular ou paracelular como resultado do tamanho diminuído das gotículas (CHOUDHURY *et al.*, 2019). O tamanho das partículas de nanoemulsão também permitem o aumento da taxa de dissolução e biodisponibilidade de drogas hidrofóbicas (SINGH *et al.*, 2017). Da mesma forma, a carga superficial de nanoemulsões interfere na penetração através de interações eletrostáticas com as camadas de muco nos epitélios (WANI *et al.*, 2018).

Portanto, a observação dos parâmetros de tamanho, índice de polidispersão e carga superficial apresentam-se importantes devido a influência que eles têm nas características da nanoemulsão produzida. Conjuntamente, a verificação da estabilidade da nanoemulsão permitem avaliar o tempo e as condições nas quais o sistema permanece estável, visando o tempo de prateleira do produto obtido.

O tamanho das partículas produzidas depende da composição da nanoemulsão e do método empregado para sua obtenção (ONODERA *et al.*, 2015). A polidispersão demonstra a uniformidade de tamanho das gotículas de nanoemulsão, sendo que

valores próximos de 1,0 pouca uniformidade entre os tamanhos da partículas e valores próximos a 0,0 sugerem que as partículas têm tamanhos semelhantes (KUMAR *et al.*, 2008). O potencial zeta indica a carga superficial da nanoemulsão e interfere diretamente nas propriedades mucoadesivas e de estabilidade do sistema (ABDOU *et al.*, 2017). Cargas superficiais altas (positivas ou negativas) influenciam na estabilidade de nanoemulsões devido ao processo de agregação das partículas (KARTHIK; ANANDHARAMAKRISHNAN, 2013).

Neste trabalho, uma nanoemulsão contendo luteolina e revestida com quitosana foi produzida e caracterizada por meio da determinação do diâmetro médio, índice de polidispersão e carga superficial das partículas. A estabilidade do sistema foi avaliada por um período de 90 dias e por ultracentrifugação, como meio de verificação da capacidade de transporte e armazenamento do produto obtido.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 OBTENÇÃO DA NANOEMULSÃO CONTENDO LUTEOLINA

A nanoemulsão contendo luteolina revestida com quitosana (NECh-LUT) foi obtida por meio de mistura da fase aquosa e fase oleosa seguida de sonicação de alta energia em disruptor de célula ultrassônico (Modelo DES500 – UNIQUE, Indaiatuba, Brasil). A LUT foi solubilizada na fase oleosa (FO), composta por ácido oleico e surfactantes. A mistura dos surfactantes Tween 20 e etilenoglicol foi adicionada a fase oleosa na proporção de 1:3 de etilenoglicol e Tween 20, de modo a obter-se EHL resultante próximo do EHL requerido do ácido oleico para a formação de NE do tipo óleo em água. A Tabela 3 mostra o cálculo do EHL para a obtenção da nanoemulsão.

Tabela 3 – Equilíbrio hidrofílico-lipofílico obtido com a mistura dos surfactantes utilizados na produção de nanoemulsão contendo LUT.

Surfactante	EHL	Proporção (%)	EHL x Proporção
Tween 20	16,7	75	12,53
Etilenoglicol	2,4	25	0,60
EHL da mistura de surfactantes			13,13

A fase aquosa (FA) contendo 0,25% de quitosana foi adicionada a fase oleosa na proporção de 2:1 FA:FO durante utilizando micro ponta de titânio (diâmetro 4 mm) e frequência ultrassônica de 16 kHz por 3 ciclos de 1 minuto. Para fins de comparação, nanoemulsão sem adição de quitosana (NE-LUT) e nanoemulsão sem fármaco (NECh-Br) foram produzidas. O tamanho de partícula e carga superficial foram utilizados como parâmetros de comparação da formulação.

4.2 DIÂMETRO MÉDIO E ÍNDICE DE POLIDISPERSÃO

Para a determinação do diâmetro médio e do índice de polidispersão foi empregada a espectroscopia de correlação de fótons ou Dynamic Light scattering

(Brookhaven 90 Plus®, Holtsville, EUA). A nanoemulsão foi diluída (5:200) em água ultrapura (Milli-Q Plus system, Merck Millipore, Burlington, EUA) e acondicionadas em uma cubeta com tampa. As análises foram realizadas com ângulo de espalhamento de 90°, à 25 °C e comprimento de onda de 659 nm. Os resultados do diâmetro médio e do índice de polidispersão foram expressos como média e desvio padrão e as amostras analisadas em triplicata.

4.3 CARGA SUPERFICIAL

A análise da carga superficial foi determinada pela análise da mobilidade eletroforética das partículas de nanoemulsão (potencial ζ) utilizando equipamento ZetaSizer (ZS - Malvern®, Malvern, Reino Unido). As amostras foram diluídas (1:100) com solução aquosa de KCL 1 e colocadas na célula eletroforética onde um potencial de ± 150 mV foi estabelecido. A análise foi realizada em triplicata e os resultados expressos como média e desvio padrão.

4.4 ESTABILIDADE DA NANOEMULSÃO

A nanoemulsão contendo luteolina foi avaliada quanto a estabilidade cinética e de armazenamento através da observação macroscópica, seguida da medida do diâmetro médio, índice de polidispersão e carga superficial das amostras. A estabilidade cinética das amostras foi verificada após centrifugação (Cientec®, Belo Horizonte, Brasil) a 5000 rpm e 25 °C por 30 minutos (BALI; ALI; ALI, 2010). A estabilidade de armazenamento foi avaliada por 90 dias a temperatura ambiente e refrigeração a 4 °C (ALZORQI *et al.*, 2016).

4.5 TRATAMENTO ESTATÍSTICO

Os resultados foram tratados estatisticamente por meio de Análise de Variância de uma via (One-way ANOVA) seguido de Teste Tukey a 95% de confiança ($p < 0,05$) utilizando software Statistica® versão 12.0 Todos os dados foram expressos como

média \pm desvio padrão e valores de p menores do que 0,05 foram considerados estatisticamente significativos.

5 RESULTADOS E DISCUSSÕES

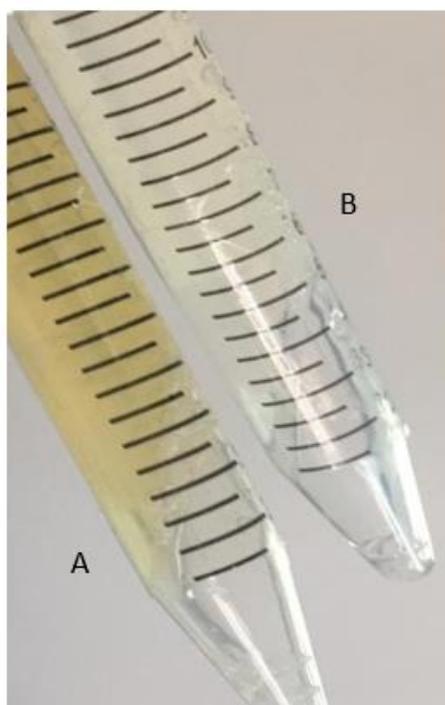
Nanoemulsões são largamente utilizadas como sistemas de entrega de fármacos devido as suas propriedades de proteção, biocompatibilidade com as membranas celulares, aumento da área de superfície e solubilidade do fármaco (CHOUDHURY *et al.*, 2019).

Neste trabalho, foram preparadas formulações de nanoemulsão contendo luteolina revestida com quitosana (NECh-LUT), nanoemulsão contendo luteolina e sem quitosana (NE-LUT) e nanoemulsão sem luteolina revestida com quitosana (NECh-Br). As formulações foram comparadas quanto ao diâmetro médio, índice de polidispersão e carga superficial. A NECh-LUT foi avaliada quanto a estabilidade cinética e de armazenamento por 90 dias.

5.1 OBTENÇÃO DA NANOEMULSÃO CONTENDO LUTEOLINA

A NECh-LUT obtida apresentou coloração amarelada, característica da luteolina, com aspecto transparente, condizente com emulsões na escala nanométrica (KAUR, 2016). A NECh-Br mostrou-se com o mesmo aspecto da primeira, porém sem a coloração amarelada atribuída ao fármaco. A Figura 11 mostra a comparação entre as formulações NECh-LUT e NECh-Br.

Figura 11 – Aspecto da nanoemulsão carregada com LUT (A) e branca (B).



Fonte: A autora.

O processo de emulsificação ocorre por meio da redução na tensão superficial entre as fases do sistema, ocasionado por surfactantes. De acordo com (DEEN; SKOVGAARD; PEDERSEN, 2016), quanto maior a habilidade do surfactante em reduzir a tensão interfacial, menor o tamanho das partículas. O surfactante Tween é utilizado na produção de nanoemulsões devido a sua capacidade de reduzir a tensão interfacial, evitando a coalescência das gotículas (ARTIGA-ARTIGAS; LANJARI-PÉREZ; MARTÍN-BELLOSO, 2018). Este surfactante não iônico age por meio de interações dipolo e ligações de hidrogênio e possuem menor toxicidade comparados aos surfactantes iônicos (CHAVDA; SHAH, 2017). Do mesmo modo, a adição de co-surfactantes permite a manipulação do balanço hidrofílico-lipofílico da nanoemulsão e auxiliam na redução da tensão interfacial entre as fases (WANI *et al.*, 2018). Shah; Imran e Ullah (2017) explicam que o uso de álcoois de cadeia curta, como etilenoglicol, aumenta a miscibilidade entre as fases aquosa e oleosa. Segundo Chatterjee *et al.* (2019), este efeito é resultado da capacidade dos co-surfactantes em penetrarem as camadas de surfactante, flexibilizando a camada interfacial. Estes compostos se

encaixam entre as áreas estruturalmente mais fracas da camada interfacial, fortalecendo-a (SINGH *et al.*, 2017).

Na formação de nanoemulsões, o uso de sonicadores permite o fornecimento da energia necessária para gerar o processo de cavitação, que consiste na geração de depressões mecânicas por meio do bombardeamento das partículas com ondas ultrassônicas, levando a formação de gotículas menores (SIRAM *et al.*, 2019). O aspecto translúcido verificado no sistema obtido neste estudo é indicativo de que as quantidades de surfactante, bem como a energia aplicada por meio de sonicador foram eficientes para a formação de nanoemulsão de tamanho menor que 300 nm (BONFERONI *et al.*, 2019).

5.2 CARACTERIZAÇÃO DAS FORMULAÇÕES DE NANOEMULSÃO

As formulações produzidas de NECh-LUT, NECh-Br e NE-LUT foram caracterizadas quanto ao diâmetro médio, índice de polidispersão e carga superficial, conforme mostra a Tabela 4. As nanoemulsões NECh-LUT e NECh-Br, revestidas com quitosana, apresentaram tamanhos de 67,5 e 62,0 nm, carga superficial de 9,09 e 10,6 mV e índice de polidispersão de 0,174 e 0,195, respectivamente, não sendo verificada diferença estatística entre elas ($p < 0,05$). Em contrapartida, a formulação contendo fármaco e sem revestimento de quitosana diferiu significativamente das demais quanto ao tamanho (39,7 nm) e carga superficial (-3,7 mV), enquanto o índice de polidispersão (0,163) não variou significativamente ($p < 0,05$). O índice de polidispersão representa a uniformidade das partículas obtidas, sendo o sistema mais uniforme quanto mais próximo de zero for o valor do índice (KUMAR *et al.*, 2008). As formulações obtidas de NECh-LUT, NECh-Br e NE-LUT apresentaram polidispersão menores que 0,2, indicando que os sistemas apresentaram tamanhos uniformes entre as partículas da nanoemulsão.

Tabela 4 – Diâmetro médio, índice de polidispersão e carga superficial das formulações de NECh-LUT, NECh-Br e NE-LUT.

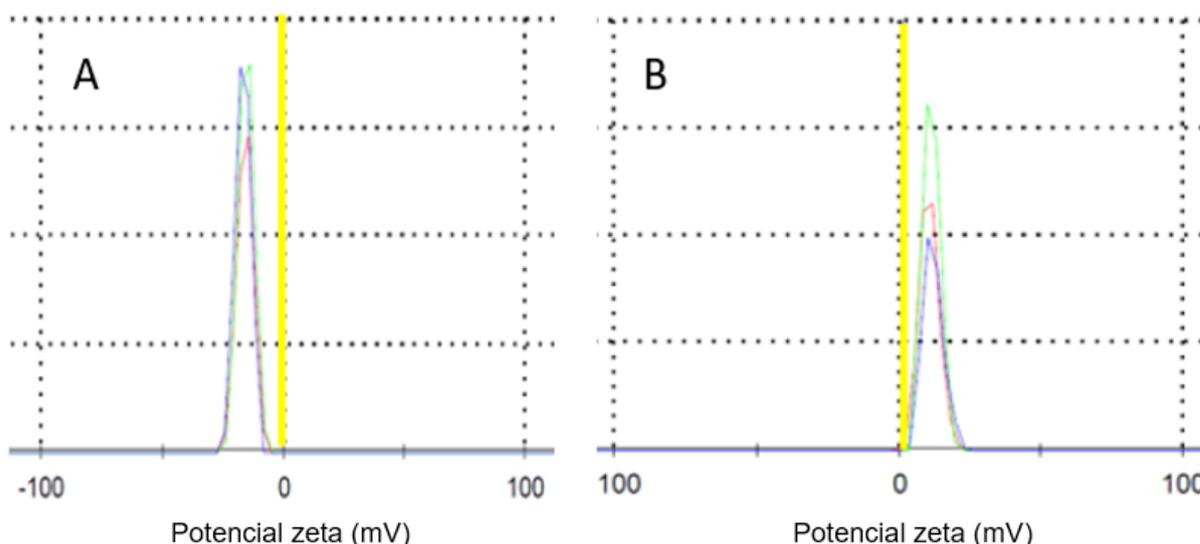
Formulação	Diâmetro médio (nm)	Índice de polidispersão	Carga superficial (mV)
NECh-LUT	67,5 ± 0,7 ^a	0,174 ± 0,02 ^a	9,09 ± 5,79 ^a
NECh-Br	62,0 ± 0,4 ^a	0,195 ± 0,01 ^a	10,6 ± 3,8 ^a
NE-LUT	39,7 ± 0,3 ^b	0,163 ± 0,01 ^a	-3,7 ± 3,8 ^b

^{a,b} Valores seguidos de mesmas letras na mesma coluna não diferem significativamente entre si ($p < 0,05$).

Liu et al. (2014) obtiveram microemulsão com luteolina pelo método de emulsificação espontânea com tamanho, polidispersão e carga superficial de 12,98 nm, 0,202 e -4,39 mV, respectivamente. Shin et al. (2018) utilizaram a técnica de cavitação em sonicador para produzir nanoemulsão contendo luteolina de 290 nm, verificando aparência levemente opaca.

Em ambas as formulações revestidas obtidas neste estudo, pode-se verificar o aumento no diâmetro das partículas e na carga superficial, características do revestimento com quitosana (ANTÔNIO et al., 2017). A carga superficial positiva observada na NECh-LUT demonstra que a adição de quitosana na fase aquosa foi eficiente para obter valores de carga superficial no intuito de aumentar a mucoadesão da nanoemulsão. A Figura 12 mostra o aumento da carga superficial da nanoemulsão revestida com quitosana.

Figura 12 – Carga superficial (mV) das nanoemulsões de luteolina sem quitosana (A) e com quitosana (B).



Shao *et al.* (2018) obteve nanoemulsão de eugenol revestida com quitosana e observou carga superficial de 2,25 mV. Abdou *et al.* (2017) verificou o aumento na carga superficial de -0,09 para 8,42 mV após a adição de quitosana na nanoemulsão contendo Zolmitriptano.

A adição de quitosana em nanoemulsões para a entrega de fármacos permite a melhora de características como liberação prolongada e aumento da permeabilidade e mucoadesão (CHAVDA; SHAH, 2017). Os grupos amino presentes na quitosana levam a diferenças na estrutura da nanoemulsão, permitindo a interação eletrostática da NE com moléculas de carga negativa presentes nas mucosas do organismo (PRADO-AUDELO *et al.*, 2020). Estes grupos amino da quitosana aumentam a carga superficial da nanoemulsão, aumentando sua interação com a mucina nas mucosas biológicas, de carga negativa (WANI *et al.*, 2018). Consequentemente, o uso da quitosana como forma de melhorar as características mucoadesivas do sistema permite a retenção da nanoemulsão no epitélio das mucosas, levando a maior absorção do fármaco (CHATTERJEE *et al.*, 2019). Além disso, o aumento da carga superficial promovido pela adição de quitosana na superfície da nanoemulsão proporciona maior estabilidade ao sistema, aumentando as forças de repulsão eletrostática entre as partículas (DING; JIANG; LIU, 2018).

5.3 ESTABILIDADE DA NECh-LUT

O aspecto translúcido e uniforme da nanoemulsão foi verificado ao longo do período de observado. O estudo de estabilidade da nanoemulsão foi realizado por meio da medida do diâmetro médio, índice de polidispersão e carga superficial. A estabilidade de armazenamento foi verificada após 7, 15, 30 e 90 dias de armazenamento a temperatura de 4 e 25 °C. A estabilidade cinética da nanoemulsão foi avaliada por meio de centrifugação a 5000 rpm por 30 minutos a 25 °C. A Tabela 5 apresenta os resultados dos testes de estabilidade da nanoemulsão contendo luteolina e revestidas com quitosana (NECh-LUT).

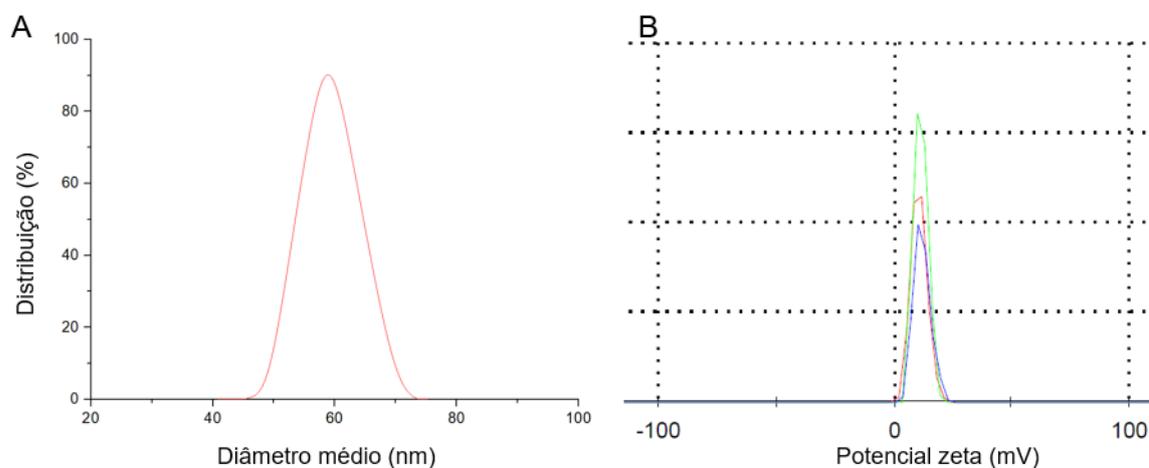
Tabela 5 – Estabilidade cinética e de armazenamento a temperatura ambiente e de refrigeração da nanoemulsão contendo luteolina revestida com quitosana.

Estabilidade	Dias	Dm (nm)	IP	PZ (mV)
Cinética	1	67,5 ± 0,7 ^a	0,174 ± 0,02 ^a	9,09 ± 5,79 ^a
	1	68,0 ± 1,5 ^a	0,163 ± 0,01 ^a	10,40 ± 3,46 ^a
25 °C	1	67,5 ± 0,7 ^a	0,174 ± 0,02 ^a	9,09 ± 5,79 ^a
	15	77,5 ± 2,8 ^a	0,147 ± 0,01 ^a	7,88 ± 2,71 ^a
	30	93,2 ± 3,0 ^b	0,206 ± 0,02 ^a	9,13 ± 2,66 ^a
	90	212,3 ± 6,3 ^c	0,282 ± 0,01 ^b	10,77 ± 2,60 ^a
4 °C	1	67,5 ± 0,7 ^a	0,174 ± 0,02 ^a	9,09 ± 5,79 ^a
	15	65,0 ± 3,6 ^a	0,303 ± 0,01 ^b	8,73 ± 4,12 ^a
	30	75,9 ± 6,7 ^a	0,252 ± 0,01 ^b	7,36 ± 2,66 ^a
	90	96,0 ± 0,5 ^b	0,235 ± 0,01 ^b	10,75 ± 0,21 ^a

^{a,b} Valores seguidos de mesmas letras na mesma coluna não diferem significativamente entre si ($p < 0,05$).

A NECh-LUT não apresentou diferença significativa entre os parâmetros analisados antes e depois do processo de centrifugação ($p < 0,05$). Da mesma forma, não foram observadas mudanças no aspecto das amostras. A Figura 13 representa graficamente os resultados de diâmetro médio e carga superficial da NECh-LUT após centrifugação.

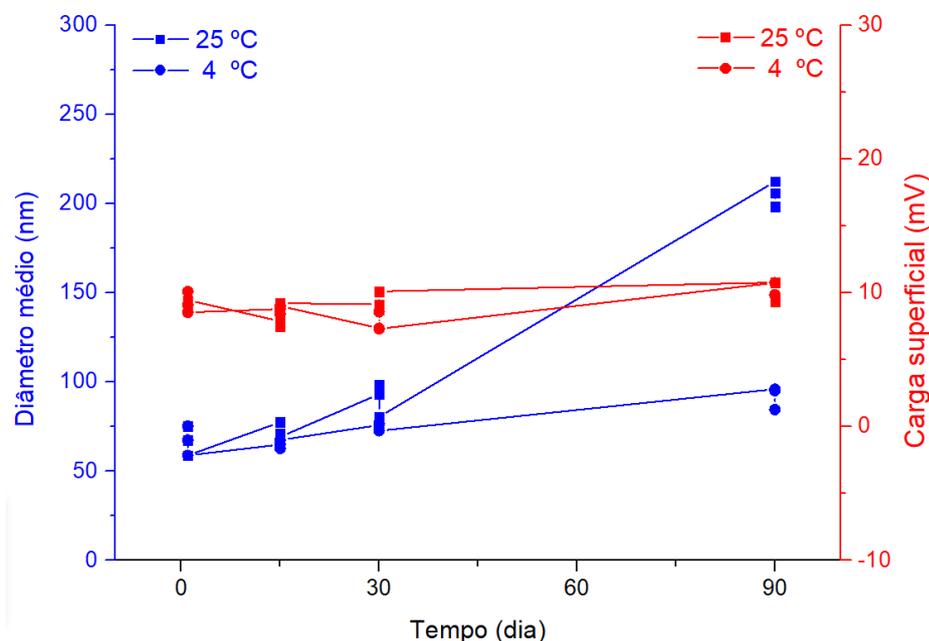
Figura 13 – Diâmetro médio (A) e carga superficial (B) da nanoemulsão contendo luteolina e revestida com quitosana após teste de estabilidade cinética.



De acordo com Siram *et al.* (2019), a estabilidade cinética é uma característica de nanoemulsões. Kaur (2016) explica que nanoemulsões tem maior resistência cinética, pois são menos suscetíveis às colisões de gotículas induzidas por movimento browniano. Ainda, como as partículas de nanoemulsão são pequenas, o movimento browniano ao qual as mesmas estão constantemente submetidas aumenta a entropia do sistema, que resulta na estabilidade cinética das partículas (PATEL; PATEL; THAKORE, 2018).

Da mesma forma, a estabilidade durante o armazenamento é um fator importante para a determinação do tempo de prateleira da nanoemulsão. A estabilidade de armazenamento da NECh-LUT é apresentada graficamente na Figura 14. Quando armazenada a temperatura ambiente por 15 dias, a nanoemulsão não apresentou aumento de tamanho e polidispersão significativos ($p < 0,05$). Contudo, a partir de 30 e 90 dias de armazenamento, a NECh-LUT teve aumento de tamanho significativo, chegando a 93,2 e 212,3 nm, respectivamente. O índice de polidispersão, que representa a uniformidade das partículas de nanoemulsão, aumentou significativamente a partir de 90 dias de armazenamento nas condições ambiente, atingindo 0,282.

Figura 14 – Estabilidade do diâmetro médio e carga superficial da nanoemulsão armazenada a temperatura ambiente e de refrigeração por 90 dias.



Analogamente, durante o armazenamento sob refrigeração, a NECh-LUT permaneceu sem mudanças significativas de tamanho por 30 dias, tendo o tamanho das partículas aumentado significativamente após 90 dias nessas condições, chegando a 96,0 nm. O índice de polidispersão da nanoemulsão, por sua vez, aumentou significativamente durante este período, chegando a 0,303 e diminuindo posteriormente. A carga superficial da nanoemulsão, considerada uma característica aliada a estabilidade, não teve variação significativa no período avaliado de 90 dias em ambas as condições. Os resultados estão de acordo com Shao *et al.* (2018), que obteve nanoemulsão contendo quitosana para encapsular eugenol, as quais não apresentaram diferenças depois de armazenadas a 4 e 25 °C por 30 dias.

A desestabilização de nanoemulsões pode acontecer por meio de dois processos: coalescência e Ostwald Ripening. O processo de coalescência ocorre pela fusão de duas ou mais gotículas em partículas maiores e pode ser evitado aumentando-se a carga superficial da nanoemulsão (MASON *et al.*, 2006). Ostwald Ripening é resultado da solubilidade da fase oleosa na fase aquosa, levando a precipitação de partículas solubilizadas em partículas maiores (SIRAM *et al.*, 2019). De acordo com Siram *et al.* (2019), a adição de estabilizador estérico e a adição de polímeros (tais como a quitosana) é eficiente na prevenção do Ostwald Ripening.

Mason *et al.* (2006) complementa que a desestabilização por Ostwald Ripenin pode ser evitada selecionando-se fase oleosa com pouca solubilidade na fase aquosa. Segundo Chatterjee *et al.* (2019), valores de carga superficial próximos a 30 mV são desejáveis para maior estabilidade de nanoemulsões. Desta forma, considerando-se a adição de quitosana na fase aquosa e a baixa solubilidade da fase oleosa nesta, aliados a carga superficial da nanoemulsão abaixo de 10 mV, é possível concluir que o aumento no diâmetro médio da nanoemulsão desenvolvida neste estudo é fruto do processo de coalescência.

Singh *et al.* (2017) explica que, embora as variações nos parâmetros avaliados não indiquem instabilidade (desde que estes apresentem parâmetros dentro dos estabelecidos para aplicação), as diferenças significativas durante o período de armazenamento podem ser utilizados para indicar as melhores condições de armazenamento e como uma orientação para melhorar a formulação. De fato, embora o tamanho e a polidispersão da NECh-LUT tenham mudado significativamente em relação aos valores iniciais durante o período de avaliação, o sistema NECh-LUT pode ainda ser considerado para aplicação após as mudanças apresentadas depois de armazenados a temperatura ambiente e refrigeração por 90 dias. Contudo, os resultados obtidos permitem concluir que mudanças na formulação, tais como o aumento da carga superficial das partículas podem contribuir para a estabilidade do sistema.

6 CONCLUSÃO

Neste trabalho, uma formulação de nanoemulsão contendo luteolina foi efetivamente obtida e revestida com quitosana. O sistema obtido apresentou tamanho, índice de polidispersão e carga superficial condizentes para a aplicação de luteolina no tratamento de doenças inflamatórias, degenerativas, microbianas e câncer. A nanoemulsão apresentou estabilidade cinética e de armazenamento durante 90 dias, mostrando capacidade de manter suas características após transporte e armazenamento. O método de cavitação em sonificador aliado aos surfactantes empregados nesta formulação mostraram-se eficientes na produção da nanoemulsão. Os próximos passos incluem a caracterização por métodos espectroscópicos, testes de liberação e atividades biológicas *in vitro* e *in vivo*.

REFERÊNCIAS

ABDOU, E. M. *et al.* Brain targeting efficiency of antimigrain drug loaded mucoadhesive intranasal nanoemulsion. **International Journal of Pharmaceutics**, [S. l.], v. 529, n. 1–2, p. 667–677, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2017.07.030>

AFORNALI, A.; LORENCINI, M. Nanoemulsions to Prevent Photoaging. *In: Nanoscience in Dermatology*. [S. l.]: Elsevier Inc., 2016. p. 237–246. *E-book*. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-802926-8.00019-7>

AGEITOS, J. M.; CHUAH, J. A.; NUMATA, K. Design considerations for properties of nanocarriers on disposition and efficiency of drug and gene delivery. **RSC Drug Discovery Series**, [S. l.], v. 2016-Janua, n. 51, p. 1–22, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1039/9781782622536-00001>

ALZORQI, I. *et al.* Optimization of ultrasound induced emulsification on the formulation of palm-olein based nanoemulsions for the incorporation of antioxidant β -D-glucan polysaccharides. **Ultrasonics Sonochemistry**, [S. l.], v. 31, p. 71–84, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2015.12.004>

AMBIGAIPALAN, P. Phenolics and polyphenolics in foods, beverages and spices: Antioxidant activity and health effects – A review. **Journal of Functional Foods**, [S. l.], v. 18, p. 820–897, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jff.2015.06.018>

ANTÔNIO, E. *et al.* Poly(lactic acid) nanoparticles loaded with ursolic acid: Characterization and in vitro evaluation of radical scavenging activity and cytotoxicity. **Materials Science and Engineering: C**, [S. l.], v. 71, p. 156–166, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.msec.2016.09.080>

ARTIGA-ARTIGAS, M.; LANJARI-PÉREZ, Y.; MARTÍN-BELLOSO, O. Curcumin-loaded nanoemulsions stability as affected by the nature and concentration of surfactant. **Food Chemistry**, [S. l.], v. 266, n. June, p. 466–474, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.06.043>

ASHAOLU, T. J. Nanoemulsions for health, food, and cosmetics: a review. **Environmental Chemistry Letters**, [S. l.], n. 0123456789, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s10311-021-01216-9>

AZIZ, N.; KIM, M.; YOUL, J. Anti-inflammatory effects of luteolin : A review of in vitro , in vivo , and in silico studies. **Journal of Ethnopharmacology journal**, [S. l.], n. May, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jep.2018.05.019>

BAKHTIARI, M. *et al.* Protective effects of flavonoids against Alzheimer's disease-related neural dysfunctions. **Biomedicine and Pharmacotherapy**, [S. l.], v. 93, p. 218–229, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2017.06.010>

BALI, V.; ALI, M.; ALI, J. Study of surfactant combinations and development of a novel

nanoemulsion for minimising variations in bioavailability of ezetimibe. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, [S. l.], v. 76, p. 410–420, 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2009.11.021>

BHOJ, Y. *et al.* Recent advancements in practices related to desalination by means of nanotechnology. **Chemical Physics Impact**, [S. l.], p. 100025, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.chphi.2021.100025>

BONFERONI, M. C. *et al.* Nanoemulsions for “nose-to-brain” drug delivery. **Pharmaceutics**, [S. l.], v. 11, n. 2, p. 1–17, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics11020084>

BUSTOS, P. S. *et al.* Flavonoids as protective agents against oxidative stress induced by gentamicin in systemic circulation. Potent protective activity and microbial synergism of luteolin. **Food and Chemical Toxicology**, [S. l.], v. 118, n. May, p. 294–302, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.fct.2018.05.030>

ÇETIN, M. *et al.* Nanoscience in Targeted Brain Drug Delivery. *In: Nanotechnology Methods for Neurological Diseases and Brain Tumors*. [S. l.]: Elsevier Inc, 2017. p. 117–147. *E-book*. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-803796-6/00007-1>

CHAKRABARTI, M.; RAY, S. K. Synergistic anti-tumor actions of luteolin and silibinin prevented cell migration and invasion and induced apoptosis in glioblastoma SNB19 cells and glioblastoma stem cells. **Brain Research**, [S. l.], v. 1629, p. 85–93, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2015.10.010>

CHATTERJEE, B. *et al.* Targeted drug delivery to the brain via intranasal nanoemulsion: Available proof of concept and existing challenges. **International Journal of Pharmaceutics**, [S. l.], v. 565, n. March, p. 258–268, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2019.05.032>

CHAUDHARY, M. **Nano-technology: applications in food industry**. [S. l.: s. n.]. v. 24 *E-book*. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-811942-6.00005-4>

CHAVDA, V. P.; SHAH, D. **Self-emulsifying delivery systems: One step ahead in improving solubility of poorly soluble drugs**. [S. l.]: Elsevier Inc., 2017. *E-book*. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-46144-3.00025-8>

CHENG, W. Y. *et al.* Luteolin inhibits migration of human glioblastoma U-87 MG and T98G cells through downregulation of Cdc42 expression and PI3K/AKT activity. **Molecular Biology Reports**, [S. l.], v. 40, n. 9, p. 5315–5326, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s11033-013-2632-1>

CHIRCOV, C.; GRUMEZESCU, A. M. Nanoemulsion preparation, characterization, and application in the field of biomedicine. *In: Nanoarchitectonics in Biomedicine*. [S. l.]: Elsevier Inc., 2019. p. 145–184. *E-book*. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-816200-2.00019-0>

CHOUDHURY, H. *et al.* **Nanoemulsions as Effective Carriers for the Treatment of Lung Cancer**. [S. l.]: Elsevier Inc., 2019. *E-book*. Disponível em:

<https://doi.org/10.1016/b978-0-12-815720-6.00009-5>

DE OLIVEIRA, D. M.; BASTOS, D. H. M. Biodisponibilidade de ácidos fenólicos. **Química Nova**, [S. l.], v. 34, n. 6, p. 1051–1056, 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/S0100-40422011000600023>

DEEN, G. R.; SKOVGAARD, J.; PEDERSEN, J. S. **Formation and properties of nanoemulsions**. [S. l.]: Elsevier Inc., 2016. *E-book*. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-804306-6.00006-4>

DING, Z.; JIANG, Y.; LIU, X. Nanemulsions-Based Drug Delivery. *In: Nanotechnology-Based Targeted Drug Delivery Systems for Brain Tumors*. [S. l.]: Elsevier Inc., 2018. p. 327–360. *E-book*. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-812218-1.00012-9>

DIRSCHERL, K. *et al.* Luteolin triggers global changes in the microglial transcriptome leading to a unique anti-inflammatory and neuroprotective phenotype. **JOURNAL OF NEUROINFLAMMATION**, [S. l.], v. 7, n. 3, p. 1–16, 2010.

DURGA, M.; NATHIYA, S.; DEVASENA, T. Multifarious actions of dietary flavonoids - Implications in cancer and cataract. **International Journal of Pharma and Bio Sciences**, [S. l.], v. 5, n. 2, p. 404–416, 2014.

ELNAGGAR, Y. S. R.; ELSHEIKH, M. A.; ABDALLAH, O. Y. Phytochylomicron as a dual nanocarrier for liver cancer targeting of luteolin: in vitro appraisal and pharmacodynamics. **Nanomedicine**, [S. l.], 2018.

GADOTTI, V. M. *et al.* Neuroimmune Responses Mediate Depression-Related Behaviors following Acute Colitis. **iScience**, [S. l.], v. 16, p. 12–21, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.isci.2019.05.012>

GADOTTI, V. M.; ZAMPONI, G. W. Anxiolytic effects of the flavonoid luteolin in a mouse model of acute colitis. **Molecular Brain**, [S. l.], v. 12, n. 1, p. 10–12, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/s13041-019-0539-z>

GANZERA, M.; MURAUER, A. Separation of Natural Products. *In: Supercritical Fluid Chromatography: Handbooks in Separation Science*. Innsbruck: Elsevier Inc., 2017. p. 439–460. *E-book*. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-809207-1.00015-X>

GROSSEN, P. *et al.* PEG-PCL-based nanomedicines: A biodegradable drug delivery system and its application. **Journal of Controlled Release**, [S. l.], v. 260, p. 46–60, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2017.05.028>

HARA, K. *et al.* Effects of intrathecal and intracerebroventricular administration of luteolin in a rat neuropathic pain model. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, [S. l.], v. 125, p. 78–84, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.pbb.2014.08.011>

HARWANSH, R. K.; DESHMUKH, R.; RAHMAN, A. Nanoemulsion: Promising

nanocarrier system for delivery of herbal bioactives. **Journal of Drug Delivery Science and Technology**, [S. l.], v. 51, n. February, p. 224–233, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jddst.2019.03.006>

HASHEMZAEI, M. *et al.* Effects of luteolin and luteolin-morphine co-administration on acute and chronic pain and sciatic nerve ligated-induced neuropathy in mice. **Journal of Complementary and Integrative Medicine**, [S. l.], v. 14, n. 1, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1515/jcim-2016-0066>

HINDARTO, C. K. *et al.* In vivo evaluation of luteolin-loaded phytosome In vivo evaluation of luteolin-loaded phytosome. **The Pharma Innovation Journal**, [S. l.], v. 6, n. 11, p. 347–349, 2017.

HOLBAN, A. M. Series Preface: Pharmaceutical Nanotechnology. **Nanostructures for the Engineering of Cells, Tissues and Organs: From Design to Applications**, [S. l.], p. xxi–xxii, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-813665-2.00022-3>

JAFARI, S. M. **Nanoencapsulation of Food Bioactive Ingredients**. 1. ed. London: Elsevier, 2017 a. *E-book*.

JAFARI, S. M. **Nanoencapsulation Technologies for the Food and Nutraceutical Industries**. Gorgan, Iran: Acedemic press, 2017 b. *E-book*.

JEONG, Y. M.; HA, J. H.; PARK, S. N. Cytoprotective effects against UVA and physical properties of luteolin-loaded cationic solid lipid nanoparticle. **Journal of Industrial and Engineering Chemistry**, [S. l.], v. 35, p. 54–62, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jiec.2015.12.014>

JIMÉNEZ-OCAMPO, R. *et al.* The role of chitosan as a possible agent for enteric methane mitigation in ruminants. **Animals**, [S. l.], v. 9, n. 11, p. 1–12, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/ani9110942>

KARTHIK, P.; ANANDHARAMAKRISHNAN, C. Fabrication of nutrient delivery system of docosahexaenoic acid nanoemulsions by high energy techniques. **RSC Advances**, [S. l.], v. 6, n. 207890, p. 22469–22475, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1039/b000000x>

KASALA, E. R. *et al.* Antioxidant and antitumor efficacy of Luteolin, a dietary flavone on benzo(a)pyrene-induced experimental lung carcinogenesis. **Biomedicine and Pharmacotherapy**, [S. l.], v. 82, p. 568–577, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2016.05.042>

KAUR, G.; MEHTA, S. K. Developments of Polysorbate (Tween) based microemulsions: Preclinical drug delivery, Toxicity and antimicrobial applications. **International Journal of Pharmaceutics**, [S. l.], 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2017.06.059>

KAUR, K. Nanoemulsions As Delivery. *In: Emulsions*. [S. l.]: Elsevier Inc., 2016. p. 611–649. *E-book*. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-804306-6/00018-0>

KIM, S. H. *et al.* Luteolin attenuates airway inflammation by inducing the transition of CD4+CD25⁻ to CD4+CD25⁺ regulatory T cells. **European Journal of Pharmacology**, [S. l.], v. 820, p. 53–64, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2017.12.003>

KUMAR, M. *et al.* Mucoadhesive nanoemulsion-based intranasal drug delivery system of olanzapine for brain targeting. **Journal of Drug Targeting**, [S. l.], v. 16, n. 10, p. 806–814, 2008. Disponível em: <https://doi.org/10.1080/10611860802476504>

KUPPUSAMY, P. *et al.* Quantification of major phenolic and flavonoid markers in forage crop *Lolium multiflorum* using HPLC-DAD. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, [S. l.], v. 28, n. 3, p. 282–288, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.bjp.2018.03.006>

LEE, E. J.; OH, S. Y.; SUNG, M. K. Luteolin exerts anti-tumor activity through the suppression of epidermal growth factor receptor-mediated pathway in MDA-MB-231 ER-negative breast cancer cells. **Food and Chemical Toxicology**, [S. l.], v. 50, n. 11, p. 4136–4143, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.fct.2012.08.025>

LI, M. *et al.* Luteolin improves the impaired nerve functions in diabetic neuropathy: Behavioral and biochemical evidences. **International Journal of Clinical and Experimental Pathology**, [S. l.], v. 8, n. 9, p. 10112–10120, 2015.

LIA, J. *et al.* Vitamin E TPGS modified liposomes enhance cellular uptake and targeted delivery of luteolin: an in vivo / in vitro evaluation. **International Journal of Pharmaceutics**, [S. l.], 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2016.08.037>

LIU, Y. *et al.* Nanostructured lipid carriers versus microemulsions for delivery of the poorly water-soluble drug luteolin. **International Journal of Pharmaceutics**, [S. l.], v. 476, n. 1, p. 169–177, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2014.09.052>

MAJUMDAR, D. *et al.* Luteolin nanoparticle in chemoprevention: In vitro and in vivo anticancer activity. **Cancer Prevention Research**, [S. l.], v. 7, n. 1, p. 65–73, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1158/1940-6207.CAPR-13-0230>

MASON, T. G. *et al.* Nanoemulsions: Formation, structure, and physical properties. **Journal of Physics Condensed Matter**, [S. l.], v. 18, n. 41, 2006. Disponível em: <https://doi.org/10.1088/0953-8984/18/41/R01>

MICHELS, G. *et al.* Pro-apoptotic effects of the flavonoid luteolin in rat H4IIE cells. **Toxicology**, [S. l.], v. 206, n. 3, p. 337–348, 2005. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.tox.2004.07.022>

NABAVI, S. F. *et al.* Luteolin as an anti-inflammatory and neuroprotective agent: a brief review. **Brain Research Bulletin**, [S. l.], 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.brainresbull.2015.09.002>

NASO, L. G. *et al.* Bovine serum albumin binding, antioxidant and anticancer properties

of an oxidovanadium(IV) complex with luteolin. **Journal of Inorganic Biochemistry**, [S. l.], v. 157, n. Iv, p. 80–93, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2016.01.021>

ONODERA, T. *et al.* Influence of particle size on the in vitro and in vivo anti-inflammatory and anti-Allergic activities of a curcumin lipid nanoemulsion. **International Journal of Molecular Medicine**, [S. l.], v. 35, n. 6, p. 1720–1728, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.3892/ijmm.2015.2186>

OSTRÓŽKA-CIEŚLIK, A.; SARECKA-HUJAR, B. The Use of Nanotechnology in Modern Pharmacotherapy. *In: Multifunctional Systems for Combined Delivery, Biosensing and Diagnostics*. [S. l.]: Elsevier Inc, 2017. p. 139–158. *E-book*. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-52725-5.00007-1>

PASQUALI, R. C.; SACCO, N.; BREGNI, C. The studies on Hydrophilic-Lipophilic Balance (HLB): Sixty years after William C. Griffin's Pioneer Work (1949-2009). **Latin American Journal of Pharmacy**, [S. l.], v. 28, n. 2, p. 313–317, 2009.

PATEL, M. R.; PATEL, R. B.; THAKORE, S. D. Nanoemulsion in drug delivery. *In: Applications of Nanocomposite Materials in Drug Delivery*. [S. l.]: Elsevier Inc., 2018. p. 667–700. *E-book*. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-813741-3.00030-3>

PATEL, R. B. *et al.* Nanoemulsion as a Valuable Nanostructure Platform for Pharmaceutical Drug Delivery. *In: Nano- and Microscale Drug Delivery Systems*. [S. l.]: Elsevier Inc., 2017. p. 321–341. *E-book*. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-52727-9/00017-0>

PENG, M. *et al.* Luteolin restricts dengue virus replication through inhibition of the proprotein convertase furin. **Antiviral Research**, [S. l.], v. 143, p. 176–185, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2017.03.026>

PÉREZ-GONZÁLEZ, M. L. D. L. *et al.* Colloids and Surfaces B: Biointerfaces Nanostructured oleic acid / polysorbate 80 emulsions with diminished toxicity in NL-20 cell line : Insights of potential drug carriers. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, [S. l.], v. 187, p. 110758, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2019.110758>

PRADO-AUDELO, M. L. Del *et al.* Chitosan-decorated nanoparticles for drug delivery. **Journal of Drug Delivery Science and Technology**, [S. l.], p. 101896, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jddst.2020.101896>

PUND, S.; JOSHI, A.; PATRAVALE, V. Improving bioavailability of nutraceuticals by nanoemulsification. *In: Nutraceuticals*. [S. l.]: Elsevier Inc., 2016. p. 481–534. *E-book*. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-804305-9.00013-0>

QING, W. *et al.* Facile synthesis of mPEG-luteolin-capped silver nanoparticles with antimicrobial activity and cytotoxicity to neuroblastoma SK-N-SH cells. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, [S. l.], v. 160, p. 390–394, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2017.09.048>

SABZICHI, M. *et al.* Luteolin-loaded Phytosomes Sensitize Human Breast Carcinoma MDA-MB 231 Cells to Doxorubicin by Suppressing Nrf2 Mediated Signalling. **Asian Pacific Journal of Cancer Prevention**, [S. l.], v. 15, p. 5311–5316, 2014.

SAHANI, S.; SHARMA, Y. C. Advancements in applications of nanotechnology in global food industry. **Food Chemistry**, [S. l.], v. 342, p. 128318, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.128318>

SEMENOVA, A. A.; TARASOV, A. B.; GOODILIN, E. A. Periodic table of elements and nanotechnology. **Mendeleev Communications**, [S. l.], v. 29, n. 5, p. 479–485, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.mencom.2019.09.001>

SHAH, M. R.; IMRAN, M.; ULLAH, S. Nanoemulsions. *In: Lipid-Based Nanocarriers for Drug Delivery and Diagnosis*. [S. l.]: Elsevier, 2017. p. 111–137. *E-book*. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-52729-3.00004-4>

SHAH, M. R.; ULLAH, S.; IMRAN, M. Nanostructured lipid carriers. *In: Lipid-based Nanocarriers for Drug Delivery and Diagnosis*. [S. l.]: Elsevier Inc, 2017. p. 37–61. *E-book*. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-52729-3.00002-0>

SHAO, Y. *et al.* Eugenol-chitosan nanoemulsions by ultrasound-mediated emulsification: Formulation, characterization and antimicrobial activity. **Carbohydrate Polymers**, [S. l.], v. 193, n. December 2017, p. 144–152, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2018.03.101>

SHEGOKAR, R. *et al.* **Lipid-Based Nanoparticles for Targeted Drug Delivery of Anticancer Drug**. [S. l.]: Elsevier Inc., 2017. *E-book*. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-809717-5.00011-7>

SHI, R.; ONG, C.; SHEN, H. Luteolin sensitizes tumor necrosis factor- α -induced apoptosis in human tumor cells. **Oncogene**, [S. l.], v. 23, p. 7712–7721, 2004. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1208046>

SHIN, K. *et al.* Nanoemulsion Vehicles as Carriers for Follicular Delivery of Luteolin. **Controlled Release and Delivery Systems**, [S. l.], 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1021/acsbiomaterials.8b00220>

SHINDE, P. *et al.* Synthesis of luteolin loaded zein nanoparticles for targeted cancer therapy improving bioavailability and efficacy. **Journal of Drug Delivery Science and Technology**, [S. l.], v. 52, n. April, p. 369–378, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jddst.2019.04.044>

SINGH, R.; KUMARI, P.; KUMAR, S. Nanotechnology for enhanced bioactivity of bioactive phytomolecules. *In: Nutrient Delivery*. [S. l.]: Elsevier Inc., 2017. p. 413–456. *E-book*. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-804304-2.00011-1>

SINGH, Y. *et al.* Nanoemulsion: Concepts, development and applications in drug delivery. **Journal of Controlled Release**, [S. l.], v. 252, p. 28–49, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2017.03.008>

SIRAM, K. *et al.* Pharmaceutical nanotechnology: Brief perspective on lipid drug delivery and its current scenario. *In: Biomedical Applications of Nanoparticles*. [S. l.]: Elsevier Inc., 2019. p. 91–115. *E-book*. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-816506-5.00005-x>

SPAGNUOLO, C.; MOCCIA, S.; RUSSO, G. L. Anti-inflammatory effects of flavonoids in neurodegenerative disorders. **European Journal of Medicinal Chemistry**, [S. l.], p. 1–11, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2017.09.001>

SRAVANTHI, V. *et al.* Oleic acid nanoemulsion for nasal vaccination: Impact on adjuvanticity based immune response. **Journal of Drug Delivery Science and Technology**, [S. l.], 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jddst.2015.05.007>

SUI, J. Q.; XIE, K. P.; XIE, M. J. Inhibitory effect of luteolin on the proliferation of human breast cancer cell lines induced by epidermal growth factor. **Sheng li xue bao : [Acta physiologica Sinica]**, [S. l.], v. 68, n. 1, p. 27–34, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.13294/j.aps.2016.0005>

TAGHIPOUR, Y. D.- *et al.* Polyphenol nanoformulations for cancer therapy: experimental evidence and clinical perspective. **International Journal of Nanomedicine**, [S. l.], p. 2689–2702, 2017.

TAN, L. *et al.* Pharmacodynamic Effect of Luteolin Micelles on Alleviating Cerebral Ischemia Reperfusion Injury. **Pharmaceutics**, [S. l.], v. 10, n. 248, p. 1–17, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics10040248>

TÖRMÄKANGAS, L. *et al.* In vivo treatment of acute Chlamydia pneumoniae infection with the flavonoids quercetin and luteolin and an alkyl gallate, octyl gallate, in a mouse model. **Biochemical Pharmacology**, [S. l.], v. 70, n. 8, p. 1222–1230, 2005. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2005.07.012>

WANG, G. G. *et al.* Protective Effects of Luteolin on Diabetic Nephropathy in STZ-Induced Diabetic Rats. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, [S. l.], v. 2011, p. 1–7, 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1155/2011/323171>

WANG, L. *et al.* Preparation and characterization of luteolin nanoparticles for enhance bioavailability and inhibit liver microsomal peroxidation in rats. **Journal of Functional Foods**, [S. l.], v. 55, n. December 2018, p. 57–64, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jff.2019.01.054>

WANI, T. A. *et al.* **Safety of Nanoemulsions and Their Regulatory Status**. [S. l.]: Elsevier Inc., 2018. *E-book*. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-811838-2.00019-9>

WONG, J. K. L. *et al.* Will Nanotechnology Bring New Hope for Gene Delivery? **Trends in Biotechnology**, [S. l.], v. 35, n. 5, p. 434–451, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2016.12.009>

WU, G. *et al.* Liposome encapsulated luteolin showed enhanced antitumor efficacy to colorectal carcinoma. **MOLECULAR MEDICINE REPORTS**, [S. l.], v. 17, p. 2456–2464, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.3892/mmr.2017.8185>

YAQOOB, A. A. *et al.* Recent Advances in Metal Decorated Nanomaterials and Their Various Biological Applications: A Review. **Frontiers in Chemistry**, [S. l.], v. 8, n. May, p. 1–23, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.3389/fchem.2020.00341>

YU, S. *et al.* Chitosan and Chitosan Coating Nanoparticles for the Treatment of Brain Disease. **International Journal of Pharmaceutics**, [S. l.], 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2019.02.012>

ZHAO, G. *et al.* Postischemic administration of liposome-encapsulated luteolin prevents against ischemia-reperfusion injury in a rat middle cerebral artery occlusion model. **Journal of Nutritional Biochemistry**, [S. l.], v. 22, n. 10, p. 929–936, 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2010.07.014>

ZHENG, S. *et al.* Application of luteolin nanomicelles anti-glioma effect with improvement in vitro and in vivo. **Oncotarget**, [S. l.], v. 8, n. 37, p. 61146–61162, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.18632/oncotarget.18019>