

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
FACULDADE DE FARMÁCIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

**NOVAS FORMAS FARMACÊUTICAS CONTENDO ÓLEO VOLÁTIL DE  
*Cymbopogon citratus*: ESTUDOS DE FORMULAÇÃO, ESTABILIDADE  
E ATIVIDADE BIOLÓGICA**

CRISTIANE DE BONA DA SILVA

Porto Alegre, 2005.



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
FACULDADE DE FARMÁCIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

**NOVAS FORMAS FARMACÊUTICAS CONTENDO ÓLEO VOLÁTIL DE  
*Cymbopogon citratus*: ESTUDOS DE FORMULAÇÃO, ESTABILIDADE  
E ATIVIDADE BIOLÓGICA**

Tese apresentada por **Cristiane de Bona da Silva** para  
obtenção do TÍTULO DE DOUTOR em Ciências  
Farmacêuticas

Orientadores: Profa. Dra. Elfrides Eva Scherman Schapoval  
Profa. Dra. Sílvia Stanisçuaski Guterres

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, em nível de Doutorado da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul e aprovada em 22.08.2005 pela Banca Examinadora constituída por:

Prof. Dr. Helder Ferreira Teixeira  
Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Prof. Dr. Martin Steppe  
Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Profa. Dra. Simone Gonçalves Cardoso  
Universidade Federal de Santa Maria

Profa. Dra. Terezinha de Jesus Andreoli Pinto  
Universidade de São Paulo

S586n Silva, Cristiane de Bona da

Novas formas farmacêuticas contendo óleo volátil de *Cymbopogon citratus*: estudos de formulação, estabilidade e atividade biológica / Cristiane de Bona da Silva – Porto Alegre: UFRGS, 2005. - 268 p.: il., gráf., tab.

Tese (doutorado). UFRGS. Faculdade de Farmácia. Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas.

1. *Cymbopogon citratus*. 2. Capim-cidró. 3. Óleos voláteis. 4. Gramineae. 5. Matéria-prima vegetal: métodos analíticos: validação. 6. Formulações semi-sólidas. I. Schapoval, Elfrides Eva Scherman. II. Guterres, Sílvia Stanisçuaski. III. Título.

CDU: 615.454:582.542.1

Bibliotecária responsável:

Heloísa do Canto Canabarro CRB 10/1036

Margarida Maria Cordeiro F. Ferreira – CRB10/480

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Ensino e Pesquisa em Controle de Qualidade, na cidade de Porto Alegre, com financiamento do CNPq. O autor recebeu bolsa de estudos do CNPq.



*A*

*meus pais,*

*Valmor e Celma*

*A*

*Marcelo*

*A*

*Júlia*

*Com todo o meu amor e carinho...*

*A vocês dedico este trabalho...*





## AGRADECIMENTOS

À Professora Dra. Elfrides Eva Scherman Schapoval pela orientação, dedicação e constante estímulo no desenvolvimento deste trabalho, além do apoio em diversos momentos pessoais e profissionais.

À Professora Dra. Sílvia Stanisçuaski Guterres pela orientação, amizade, dedicação e constante estímulo no aprimoramento e desenvolvimento das atividades.

Aos Professores deste Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da UFRGS.

À Professora Dra. Terezinha de Jesus Andreoli Pinto, da USP, pela oportunidade de estágio e colaboração nos ensaios de irritação dérmica.

À Lígia Luriko Miyamar e Áurea Silveira Cruz do Instituto Adolfo Lutz pelo auxílio nos experimentos de Segurança Biológica.

À Professora Dra. Maria Lúcia Scroferneker, do Instituto de Ciências Básicas da Saúde da UFRGS, pela aquisição das cepas de *C. albicans*.

Aos amigos e professores do Laboratório de Controle de Qualidade: Célia, Leila, Lorena, Martin e Tércio, pelo auxílio, colaboração e amizade.

A todos os amigos do Laboratório de Ensino e Pesquisa em Controle de Qualidade, pelas discussões, amizade, pelo carinho e momentos de descontração.

À Vanessa Weisheimer pela amizade, dedicação e colaboração na realização dos experimentos.

Ao Ruy Carlos Beck pela convivência amiga, carinho e apoio nos diversos momentos.

À Ana Rita, Andréia, Cássia, Clésio, Júlia, Magda, Scheila, pela amizade e convivência.

Aos meus irmãos, Clarissa e Fabrício, pela amizade, confiança e apoio em mais esta etapa de minha vida.

A todos que mesmo não citados, contribuíram para o desenvolvimento deste trabalho...



---

**SUMÁRIO**

LISTA DE FIGURAS.....	xiii
LISTA DE TABELAS.....	xvii
LISTA DE ABREVIATURAS.....	xxi
RESUMO.....	xxiii
ABSTRACT.....	xxv
APRESENTAÇÃO.....	xxvii
1 INTRODUÇÃO.....	01
2 OBJETIVOS.....	07
2.1 Objetivos gerais.....	09
2.2 Objetivos específicos.....	09
3. REVISÃO DE LITERATURA.....	11
3.1 Micoses Superficiais.....	13
3.1.1 Dermatomicoses.....	13
3.1.1.1 Tratamento das dermatomicoses.....	20
3.1.1.2 Onicomicoses.....	23
3.1.2 Candidíases superficiais.....	27
3.1.2.1 Candidíases cutâneas.....	29
3.1.2.2 Onicomicoses causadas por <i>Candida spp.</i> .....	31
3.1.2.3 Vulvovaginites.....	32
3.1.2.4 Candidíase da mucosa oral.....	34
3.1.3 Utilização de óleos voláteis no tratamento de micoses superficiais.....	35
3.2 Óleo volátil de <i>Cymbopogon citratus</i> .....	39
3.2.1 Atividade antimicrobiana.....	41
3.2.2 Mecanismo de ação.....	47
3.2.3 Quantificação.....	53
3.3 Irritação Dérmica.....	56
3.4 Nanocápsulas.....	63
3.5 Estabilidade de Medicamentos.....	66
3.5.1 Fotoestabilidade.....	71
3.5.2 Cinética química.....	73
3.5.3 Óleos voláteis.....	75

4 PARTE EXPERIMENTAL.....	79
4.1 Matérias-primas.....	81
4.2 Métodos.....	83
4.2.1 Óleo volátil.....	83
4.2.1.1 Determinação do teor de citral por cromatografia gasosa (CG).....	83
4.2.1.2 Avaliação da atividade antifúngica do óleo volátil e do citral.....	84
4.2.1.3 Resultados e discussão.....	85
4.2.2 Suspensões de nanocápsulas (NC).....	91
4.2.2.1 Preparação.....	91
4.2.2.2 Caracterização físico-química das nanopartículas.....	92
4.2.2.2.1 Determinação do pH.....	92
4.2.2.2.2 Determinação do diâmetro médio das partículas.....	92
4.2.2.2.3 Determinação do teor de citral presente nas suspensões de NC.....	92
4.2.2.2.4 Avaliação morfológica das suspensões de NC.....	93
4.2.2.3 Resultados e discussão.....	93
4.2.3 Formulações semi-sólidas.....	99
4.2.3.1 Preparação.....	99
4.2.3.1.1 Emulsão não-iônica O/A (ENI).....	99
4.2.3.1.2 Géis: gel hidrofílico (GH) e gel lipofílico (GL).....	100
4.2.3.1.3 Formulações de referência.....	101
4.2.3.2 Avaliação das propriedades físico-químicas das formulações.....	102
4.2.3.2.1 Análise macroscópica.....	102
4.2.3.2.2 Determinação do pH.....	102
4.2.3.2.3 Teste de centrifugação.....	102
4.2.3.2.4 Avaliação da viscosidade das formulações.....	102
4.2.3.3 Avaliação da atividade antifúngica das formulações.....	103
4.2.3.3.1 Atividade antifúngica frente à <i>Candida albicans</i> .....	103
4.2.3.3.2 Atividade antifúngica frente a dermatófitos.....	104
4.2.3.4 Resultados e discussão.....	105
4.2.3.4.1 Determinações físico-químicas.....	105
4.2.3.4.2 Avaliação da atividade antifúngica.....	113
4.2.4 Determinação quantitativa.....	118
4.2.4.1 Absorção na região do ultravioleta.....	118
4.2.4.2 Condições experimentais.....	118
4.2.4.3 Preparação da curva padrão.....	119
4.2.4.4 Preparação das amostras.....	120
4.2.4.4.1 Óleo volátil.....	120

---

4.2.4.4.1.1 Teste de recuperação.....	120
4.2.4.4.2 Emulsões.....	120
4.2.4.4.2.1 Teste de recuperação.....	121
4.2.4.5 Cálculos.....	121
4.2.4.6 Validação.....	123
4.2.4.7 Resultados.....	124
4.2.4.8 Discussão.....	134
4.2.5 Irritação cutânea primária.....	140
4.2.5.1 Testes <i>in vivo</i> .....	140
4.2.5.2 Testes <i>in vitro</i> .....	142
4.2.5.2.1 Procedimento.....	143
4.2.5.3 Resultados.....	144
4.2.5.4 Discussão.....	146
4.2.6 Estudos de estabilidade.....	151
4.2.6.1 Cinética de degradação fotoquímica do óleo volátil.....	151
4.2.6.1.1 Condições do estudo.....	151
4.2.6.2 Estabilidade térmica das formulações.....	152
4.2.6.2.1 Condições do estudo.....	152
4.2.6.2.2 Testes empregados.....	153
4.2.6.3 Resultados.....	154
4.2.6.3.1 Cinética de degradação fotoquímica do óleo volátil.....	154
4.2.6.3.2 Estabilidade das formulações.....	159
4.2.6.4 Discussão.....	165
4.2.7 Avaliação da atividade antifúngica <i>in vivo</i> .....	174
4.2.7.1 Resultados e discussão.....	175
5 DISCUSSÃO GERAL.....	181
6 CONCLUSÕES.....	191
7 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	197
8 PUBLICAÇÕES.....	201
9 REFERÊNCIAS.....	209
10 ANEXOS.....	227

---



---

**LISTA DE FIGURAS**

Figura 3.1 –	Estrutura química do citral.	40
Figura 4.1–	Cromatogramas obtidos por CLAE para SQR (A) e suspensão de NC contendo o óleo volátil (B).	96
Figura 4.2 –	Fotomicrografias obtidas a partir de nanocápsulas de Eudragit S100 <sup>®</sup> contendo o óleo volátil de <i>C. citratus</i> por MET.	98
Figura 4.3 –	Representação gráfica da viscosidade em função da velocidade, para as formulações ENIO3, ENIO5 e ENINC <sub>OV</sub> .	107
Figura 4.4 –	Representação gráfica da viscosidade em função da velocidade, para as formulações GHO e GLO.	108
Figura 4.5 –	Representação gráfica da tensão de cisalhamento em função da velocidade de cisalhamento para a formulação ENIO3.	109
Figura 4.6 –	Representação gráfica da tensão de cisalhamento em função da velocidade de cisalhamento para a formulação ENIO5.	110
Figura 4.7 –	Representação gráfica da tensão de cisalhamento em função da velocidade de cisalhamento para a formulação ENINC <sub>OV</sub> .	110
Figura 4.8 –	Representação gráfica da tensão de cisalhamento em função da velocidade de cisalhamento para a formulação GHO.	111
Figura 4.9 –	Representação gráfica da tensão de cisalhamento em função da velocidade de cisalhamento para a formulação GLO.	111
Figura 4.10 –	Atividade antifúngica frente ao <i>M. canis</i> .	115
Figura 4.11 –	Espectros de absorção no ultravioleta do citral em <i>n</i> -hexano, utilizando espectrofotômetro UV/VIS Shimadzu UV 16A.	124
Figura 4.12 –	Representação gráfica da curva padrão de citral obtida por CLAE.	125
Figura 4.13 –	Cromatogramas obtidos por CLAE para SQR (A), óleo volátil (B) e formulação ENIO5 (C) e formulação ENINC <sub>OV</sub> (D) de citral, a 20 µg/ml.	131
Figura 4.14 –	Espectros de absorção no ultravioleta do citral em <i>n</i> -hexano, utilizando espectrofotômetro UV/VIS Shimadzu UV 16A. (A) SQR; (B) formulação ENIO5.	131

Figura 4.15 –	Cromatogramas obtidos por CLAE para SQR (A), solução de geraniol (2 µg/ml) (B), base ENI (C) e base ENINC (D).	133
Figura 4.16 –	Espectros de absorção no ultravioleta do citral em <i>n</i> -hexano (20 µg/ml) e solução de geraniol (2 µg/ml), utilizando espectrofotômetro UV/VIS Shimadzu UV 16A.	134
Figura 4.17 –	Espectros de absorção no ultravioleta do citral em <i>n</i> -hexano, utilizando espectrofotômetro UV/VIS Shimadzu UV 16A. (A) SQR, (B) SQR e geraniol.	138
Figura 4.18 –	Representação gráfica da fotodegradação de citral em função do tempo, obtida a partir de amostras de óleo volátil, armazenadas sob luz UV (254 nm).	157
Figura 4.19 –	Representação gráfica da fotodegradação de citral em função do tempo, obtida a partir de amostras da SQR, armazenadas sob luz UV (254 nm).	157
Figura 4.20 –	Representação gráfica da degradação térmica de citral em função do tempo, obtida a partir das amostras das formulações ENIO3, ENIO5 e ENINC <sub>OV</sub> armazenadas a 7 °C.	160
Figura 4.21 –	Representação gráfica da degradação térmica de citral em função do tempo, obtida a partir das amostras das formulações ENIO3, ENIO5 e ENINC <sub>OV</sub> armazenadas a 25 °C.	160
Figura 4.22 –	Representação gráfica da degradação térmica de citral em função do tempo, obtida a partir das amostras das formulações ENIO3, ENIO5 e ENINC <sub>OV</sub> armazenadas a 40 °C.	161
Figura 4.23 –	Cromatogramas do citral, a 20 µg/ml, para as amostras de óleo volátil submetidas à luz UV (254 nm).	168
Figura 4.24 –	Cromatogramas do citral, a 20 µg/ml, para as amostras submetidas à luz UV (254 nm).	168
Figura 4.25 –	Oxidação do citral (GALIËN, 2003).	171
Figura 4.26 –	Mecanismo de conversão de citral e γ-terpineno em <i>p</i> -cimeno.	172
Figura 4.27 –	Isomerização do citral (GALIËN, 2003).	173
Figura 4.28 –	Fotomicrografias de candidíase cutânea em cobaias.	177



- Figura 4.29 – Fotomicrografias de candidíase cutânea em cobaias – 12º dia após a infecção. 177
- Figura 4.30 – Comparação da medida do tamanho dos pêlos (mm) entre as formulações utilizadas no tratamento tópico de candidíase cutânea em cobaias, realizada no 12º dia após a infecção. 179



---

**LISTA DE TABELAS**

Tabela 3.1 –	Ecologia e incidência dos dermatófitos no continente Americano.	17
Tabela 3.2 –	Fármacos antifúngicos empregados no tratamento de dermatomicoses.	23
Tabela 3.3 –	Pesquisas envolvendo a atividade antimicrobiana do óleo volátil de <i>C. citratus</i> , em especial frente a espécies causadoras de infecções humanas e animais.	41
Tabela 4.1 –	Valores dos diâmetros dos halos de inibição (mm) obtidos na avaliação da atividade antifúngica do óleo volátil de <i>C. citratus</i> , frente a espécies de <i>Candida</i> .	87
Tabela 4.2 –	Valores dos diâmetros dos halos de inibição (mm) obtidos na avaliação da atividade antifúngica do citral, frente a espécies de <i>Candida</i> .	87
Tabela 4.3 –	Comparação dos resultados obtidos por RAUBER (2001) na avaliação da atividade antifúngica do óleo volátil de <i>C. citratus</i> frente à <i>C.albicans</i> ATCC 10231.	90
Tabela 4.4 –	Componentes empregados na preparação das suspensões de NC.	91
Tabela 4.5 –	Características das suspensões de NC contendo óleo volátil de <i>C. citratus</i> .	96
Tabela 4.6 –	Componentes empregados na preparação das emulsões.	100
Tabela 4.7 –	Componentes empregados na preparação dos géis.	101
Tabela 4.8 –	Características sensoriais e valores de pH das formulações semi-sólidas em estudo.	106
Tabela 4.9 –	Diâmetro dos halos de inibição obtidos para as formulações, através do ensaio microbiológico de difusão em ágar – pocinhos.	113
Tabela 4.10 –	Parâmetros utilizados na execução do método por CLAE.	119
Tabela 4.11 –	Valores experimentais obtidos na determinação da curva padrão de citral, por CLAE.	125

Tabela 4.12 –	Análise de variância das áreas absolutas determinadas para a obtenção da curva padrão de citral por CLAE.	126
Tabela 4.13 –	Valores experimentais obtidos para a determinação de citral no óleo volátil, por CLAE.	127
Tabela 4.14 –	Valores experimentais obtidos na avaliação da precisão intermediária de citral no óleo volátil, por CLAE.	127
Tabela 4.15 –	Valores experimentais obtidos para a determinação de citral na formulação ENIO5, por CLAE.	128
Tabela 4.16 –	Valores experimentais obtidos na avaliação da precisão intermediária na formulação ENIO5, por CLAE.	128
Tabela 4.17 –	Valores experimentais obtidos para a determinação de citral na formulação ENIO3, por CLAE.	129
Tabela 4.18 –	Valores experimentais obtidos para a determinação de citral na formulação ENINC <sub>OV</sub> , por CLAE.	129
Tabela 4.19 –	Valores experimentais obtidos na avaliação da precisão intermediária na formulação ENINC <sub>OV</sub> , por CLAE.	130
Tabela 4.20 –	Valores experimentais do teste de recuperação realizado para o óleo volátil de <i>C. citratus</i> contendo citral, por CLAE.	132
Tabela 4.21 –	Valores experimentais do teste de recuperação realizado para a formulação ENIO5, por CLAE.	132
Tabela 4.22 –	Valores experimentais do teste de recuperação realizado para a formulação ENINC <sub>OV</sub> , por CLAE.	132
Tabela 4.23 –	Valores de edema e eritema observados após aplicação das formulações em estudo.	144
Tabela 4.24 –	Índices de Irritação Primária (IIP) obtidos para as formulações em estudo.	145
Tabela 4.25 –	Diâmetros dos halos de toxicidade (cm) obtidos para as formulações em estudo, empregando a linhagem celular NCTC clone 929.	145
Tabela 4.26 –	Citotoxicidade das formulações graduada em Índice de Zona (IZ), segundo a USP 28, 2005.	146

---

Tabela 4.27 –	Teores de citral no óleo volátil em função do tempo, obtidos a partir de amostras mantidas à luz UV (254 nm).	154
Tabela 4.28	Teores de citral na SQR em função do tempo, obtidos a partir de amostras mantidas à luz UV (254 nm).	155
Tabela 4.29	Valores de coeficientes de correlação, considerando diferentes ordens de reação, obtidos a partir das amostras de óleo volátil submetidas a degradação sob luz UV (254 nm).	155
Tabela 4.30	Valores de coeficientes de correlação, considerando diferentes ordens de reação, obtidos a partir das amostras de citral (SQR) submetidas a degradação sob luz UV (254 nm).	156
Tabela 4.31 –	Valores das velocidades de degradação (K) de citral, obtidos segundo uma cinética de ordem zero, para o óleo volátil.	158
Tabela 4.32 –	Valores das velocidades de degradação (K) de citral, obtidos segundo uma cinética de ordem zero, para a SQR.	158
Tabela 4.33 –	Valores dos diâmetros dos halos de inibição obtidos na avaliação da atividade antifúngica do óleo volátil e de citral, submetidos à fotodegradação, por 16 dias, frente à cepa de <i>C. albicans</i> ATCC 10231.	159
Tabela 4.34 –	Teores de citral nas formulações ENIO3, ENIO5 E ENINC <sub>OV</sub> em função do tempo, obtidos a partir de amostras mantidas a 7 °C ± 2 °C.	162
Tabela 4.35 –	Teores de citral nas formulações ENIO3, ENIO5 E ENINC <sub>OV</sub> em função do tempo, obtidos a partir de amostras mantidas a 25 °C ± 2 °C.	162
Tabela 4.36 –	Teores de citral nas formulações ENIO3, ENIO5 E ENINC <sub>OV</sub> em função do tempo, obtidos a partir de amostras mantidas a 40 °C ± 2 °C.	163
Tabela 4.37 –	Valores de pH obtidos para as amostras da formulação ENIO3, mantidas as temperaturas de 7, 25 e 40 °C.	163
Tabela 4.38 –	Valores de pH obtidos para as amostras da formulação ENIO5, mantidas as temperaturas de 7, 25 e 40 °C.	164
Tabela 4.39 –	Valores de pH obtidos para as amostras da formulação ENINC <sub>OV</sub> , mantidas as temperaturas de 7, 25 e 40 °C.	164

Tabela 4.40 – Comprimento dos pêlos (mm), retirados das regiões no 12º dia após a infecção.	178
---	-----

## LISTA DE ABREVIATURAS

ABIFRA	Associação Brasileira das Indústrias de Óleos Essenciais, Produtos Químicos Aromáticos, Fragrâncias, Aromas e Afins
ASTM	American Society for Testing and Materials
ATCC	American Type Culture Collections
AUFS	Absorbance Units of Full Scale
C	Concentração
ENI	Emulsão não-iônica
ENI <sub>CETO</sub>	Emulsão não-iônica com cetoconazol
ENINC	Emulsão não-iônica com suspensão de NC
ENINC <sub>OV</sub>	Emulsão não-iônica com suspensão de NC contendo óleo volátil
ENI <sub>NIST</sub>	Emulsão não-iônica com nistatina
ENIO3	Emulsão não-iônica com óleo volátil a 3%
ENIO5	Emulsão não-iônica com óleo volátil a 5%
GH	Gel hidrofílico
GHO	Gel hidrofílico com óleo volátil a 5%
GL	Graus de liberdade
GL	Gel lipofílico
GLO	Gel lipofílico com óleo volátil a 5%
IC	Isolado clínico
IFRA	International Fragrance Association
IIP	Índice de Irritação Primária
IZ	Índice de Zona
K	Constante de velocidade de degradação
MET	Microscopia Eletrônica de Trasmisão
NC	Nanocápsulas
NS	Nanoesferas
OECD	Organisation for Economic Co-operation and Development
SQR	Substância química de referência
t	Tempo
t <sub>90%</sub>	Tempo de vida útil





## RESUMO

**Palavras-chave:** óleo volátil, *Cymbopogon. citratus*, citral, formulações semi-sólidas, atividade antifúngica, validação, estabilidade.

Neste trabalho foram desenvolvidas novas formulações contendo o óleo volátil de *C. citratus* (emulsões e géis) para avaliação biológica e estabilidade. O óleo volátil, obtido comercialmente, foi caracterizado em relação ao teor de citral, por CG (76%), e sua atividade antifúngica frente a espécies de *Candida* foi, também, estudada. O óleo volátil apresentou atividade frente a todas as espécies de *Candida* empregadas. A atividade antifúngica do citral, seu principal componente, foi avaliada, obtendo-se resultados semelhantes. O óleo volátil foi incorporado em suspensão de nanocápsulas e os resultados obtidos na sua caracterização possibilitaram a incorporação de tais sistemas em uma base semi-sólida. As formulações semi-sólidas foram avaliadas em relação a suas propriedades físico-químicas (caracteres organolépticos, pH, centrifugação e viscosidade) e atividade antifúngica *in vitro* frente à *C. albicans* e fungos dermatófitos. As preparações apresentaram atividade contra os fungos estudados, inibindo, totalmente, o crescimento das espécies *M. canis* e *T. rubrum*. Em virtude das características apresentadas, as emulsões foram selecionadas para posterior avaliação da estabilidade, toxicidade dérmica e atividade antifúngica *in vivo*. Adicionalmente, um novo método de quantificação de citral foi desenvolvido e validado, por CLAE. O método proposto mostrou-se linear, preciso, exato e específico, e possibilitou quantificar tal substância no óleo volátil, nas suspensões de nanocápsulas e nas emulsões semi-sólidas. A estabilidade fotoquímica do óleo volátil foi avaliada. Testes acelerados foram conduzidos com o óleo volátil e citral, expostos à lâmpada germicida (254 nm), por um período de 16 dias. A concentração de citral nas amostras foi avaliada por CLAE e a cinética de degradação foi, também, estimada. Uma menor velocidade de degradação de citral no óleo volátil foi verificada. As emulsões contendo o óleo volátil foram estudadas em relação à estabilidade térmica, as temperaturas de 7, 25 e 40 °C. Verificou-se que o calor interfere na estabilidade do citral, e os produtos foram estáveis quando armazenados a temperatura de 7 °C, por 180 dias. Ensaio *in vivo* e *in vitro* de toxicidade dérmica foram realizados para as emulsões, as quais apresentaram grau de

irritação leve nos ensaios em animais. Diferenças foram obtidas nos testes de citotoxicidade, demonstrando a maior sensibilidade das culturas celulares e sua aplicação no desenvolvimento de novos produtos. Um estudo preliminar pré-clínico foi conduzido em cobaias para avaliação da atividade antifúngica *in vivo*. Após infecção com cepa patogênica de *C. albicans*, os animais foram tratados, topicamente, com as amostras e apresentaram uma melhora das infecções, evidenciada pelo crescimento dos pêlos.

**ABSTRACT**

New pharmaceuticals preparations containing *Cymbopogon citratus* volatile oil:  
formulation and stability studies, and biological activity

**Keywords:** volatile oil, *Cymbopogon citratus*, citral, semisolid formulations, antifungal activity, validation, stability.

In this work, new formulations containing *C. citratus* volatile oil were developed (emulsions and gels) and their biological properties and stability were studied. The citral content in the volatile oil (commercially obtained) was determined by GC (76%), and the antifungal activity against *Candida* species was studied. The oil and its major component, citral, exhibited action against all *Candida* spp. Nanocapsules suspensions and semisolid formulations containing *C. citratus* volatile oil were prepared, and the physico-chemical properties were evaluated (organoleptic characteristics, pH, centrifugation test and viscosity). The *in vitro* antifungal activity against *C. albicans* and dermatophytes fungals were evaluated for the semisolid formulations. The growing of the *M. canis* and *T. rubrum* species was totally inhibited by the preparations tested. The emulsions were selected and their stability, dermal toxicity and *in vivo* antifungal activity were evaluated. In addition, a new HPLC method to quantify the citral contents was developed and validated. The HPLC method showed good performance and demonstrated to be linear, precise, accurate and sensitive. It could be used to quantify citral in volatile oil, nanocapsules suspensions and semisolid emulsions. The photostability of the volatile oil was also evaluated. Accelerated stability tests were conducted with volatile oil and reference citral. The samples were exposed to germicidal lamps (254 nm) for 16 days. The content of citral in the samples was determined by HPLC and the kinetic degradation was estimated. In the volatile oil, the rate of citral degradation was lower than in the reference citral. The thermal stability of the emulsions was studied at 7, 25 and 40 °C. It was observed that heat affected the citral stability. The products were stable at 7 °C for 180 days. *In vivo* and *in vitro* tests of dermal toxicity were conducted. The emulsions containing volatile oil were classified as slightly irritant in animal tests. Moreover, the *in vitro* tests showed that the cellular cultures were more

sensitive, and can be applied in the development of the new products. In the *in vivo* antifungal activity, a preliminary preclinical study was conducted using guinea pigs. The animals were infected with pathogenic *C. albicans* yeast, and after, topically treated with the formulations. The improvement of the infections was observed and evaluated by hear growing.

## **APRESENTAÇÃO**

Face aos diferentes métodos experimentais empregados e com o objetivo de proporcionar uma melhor compreensão das etapas desenvolvidas, este trabalho está apresentado da seguinte maneira: Introdução, Objetivos, Revisão de Literatura, Parte Experimental, Discussão Geral, Conclusões e Considerações Finais. A Parte Experimental apresenta a descrição da metodologia, com os resultados e discussão de cada método empregado, separadamente. No final, será apresentada uma discussão geral de todos os aspectos abordados neste trabalho.





---

## 1 INTRODUÇÃO



As investigações sobre doenças causadas por fungos em humanos datam de descobertas realizadas a.C. Possivelmente, um dos primeiros relatos seja de Eurípedes, entre os anos 456-450 a.C. sobre uma mãe e três filhos que morreram após ingerirem um fungo. O “sapinho”, lesão oral causada por *Candida*, foi descrito por Hipócrates (V a.C.) e Celso, 30 a.D., descreveu o favo (tinha do couro cabeludo), que, em 1834, foi reconhecida como uma micose por Remak. Passadas algumas décadas, entre 1941 e 1944, David Gruby, em Paris, descreveu o microrganismo responsável pelo favo do couro cabeludo, o *Trychophyton schoenleinii*, reproduzindo a doença em uma criança (SEVERO; LONDERO, 1996).

As micoses humanas são causadas por fungos patogênicos primários, ou seja, aqueles que têm capacidade de invadir os tecidos de um hospedeiro normal, ou por fungos oportunistas, que invadem os tecidos de indivíduos com alterações graves do sistema imunodefensivo do organismo (SEVERO; LONDERO, 1996).

As dermatomicoses são infecções fúngicas comuns entre as infecções humanas e animais, chamadas, freqüentemente, de *tinhas*, causadas por fungos dermatófitos dos gêneros *Epidermophyton*, *Microsporum* e *Trichophyton*. Estes fungos infectam a pele, as unhas e o couro cabeludo e as lesões são caracterizadas por irritação, formação de escamas, vermelhidão local, inchaço e inflamação (CONTET-AUDONNEAU; SCHMUTZ, 2001; HALL, 1999; LACAZ *et al.*, 2002; LAUBE, 2004; PELCZAR *et al.*, 1996; SEVERO; LONDERO, 1996). Por outro lado, algumas micoses superficiais podem estar associadas à presença de leveduras, dentre elas, o gênero *Candida*, encontrada em pequena quantidade na pele sadia, mas que rapidamente pode colonizar a pele danificada e locais interdigitais. Além destas, pode causar infecções na mucosa oral e vaginal, e, em casos mais graves, infecções sistêmicas (ANAISSE *et al.*, 2004; CONTET-AUDONNEAU; SCHMUTZ, 2001; MIMS *et al.*, 1995).

Nas últimas décadas, o número de pacientes com infecções fúngicas tem aumentado significativamente, em parte devido ao aumento de pacientes imunodeprimidos, devido ao vírus HIV, bem como à falta de nutrição, o uso

indiscriminado e a variedade de antibióticos de amplo espectro empregados nas terapias do câncer e transplantes (DiDOMENICO, 1999; ELLIS, 2001).

O tratamento das micoses superficiais é realizado com a administração tópica e/ou oral de fármacos antifúngicos, dentre eles: nistatina, anfotericina B, derivados imidazólicos e terbinafina (ANDRIOLE, 2000; CONTET-AUDONNEAU; SCHMUTZ, 2001; HALL, 1999).

Apesar do grande número de substâncias com atividade antifúngica, somente poucas são eficazes para serem empregadas clinicamente. Alguns fármacos têm sido reformulados com o objetivo de diminuir sua toxicidade e novas substâncias são desenvolvidas, buscando uma melhor atividade e seletividade (DiDOMENICO, 1999).

A diversidade de plantas medicinais, algumas caracterizadas pela presença de substâncias com atividade antifúngica, contribui para diversos estudos que objetivam demonstrar a ação e eficácia de alguns compostos, os quais poderão ser empregados na terapia antifúngica. Exemplo desta abordagem é a utilização do látex, obtido do fruto de papaia, na Índia e Nova Guiné para o tratamento de infecções fúngicas da pele (DRAELOS, 2001).

Neste sentido, óleos voláteis ou substâncias presentes nos mesmos, têm se mostrado promissoras, podendo ser incorporadas em preparações farmacêuticas, empregadas isoladamente ou em combinação com agentes antifúngicos convencionais (HARRIS, 2002).

Fitoterápico, conforme a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), é um medicamento obtido por processos tecnologicamente adequados, no qual empregam-se, exclusivamente, matérias-primas vegetais, caracterizado pelo conhecimento de sua eficácia e dos riscos de seu uso, assim como pela reprodutibilidade e constância de sua qualidade (BRASIL, 2004a).

Assim, o desenvolvimento de um produto fitoterápico envolve uma série de experimentos, relacionados com a atividade farmacológica apresentada pela substância(s) ativa(s), aos processos tecnológicos empregados na obtenção da forma farmacêutica, aos ensaios de controle de qualidade, destinados a garantir a eficácia do produto, bem como aos ensaios pré-clínicos e clínicos necessários para comprovar a ação exercida pela substância, além de verificar possíveis reações que possam ser prejudiciais ao paciente. Neste sentido, a ANVISA determina os critérios necessários e metodologias a serem realizadas para estes produtos, através da Resolução – RDC nº 48, de 16 de março de 2004, a qual dispõe sobre o registro de medicamentos fitoterápicos; da Portaria nº 116, de 08 de agosto de 1996, que estabelece normas para o estudo da toxicidade de produtos fitoterápicos, e da Resolução – RE nº 90, de 16 de março de 2004, que publica o “Guia para a realização de estudos de toxicidade pré-clínica de fitoterápicos”.

Em virtude da acentuada atividade antifúngica apresentada pelo óleo volátil de *Cymbopogon citratus* (capim-cidró) frente à levedura de *Candida albicans* (SCHUCK *et al.*, 2001), foram desenvolvidas formulações semi-sólidas (emulsões e géis) contendo este óleo, as quais foram avaliadas quanto as suas características físico-químicas e microbiológicas. Do ponto de vista tecnológico, as formulações propostas foram viáveis, podendo ser preparadas através de técnicas simples, com excipientes usualmente empregados na indústria farmacêutica, de fácil aquisição e baixo custo. Além disso, através dos resultados obtidos na avaliação da atividade antifúngica *in vitro*, observou-se que as formulações são potencialmente indicadas para o tratamento tópico de infecções fúngicas, no qual se empregam cremes, pomadas e géis contendo fármacos antifúngicos, destinados à aplicação na pele (RAUBER, 2001).

Face a estas observações, tornou-se importante dar continuidade aos estudos relacionados ao desenvolvimento e otimização de formulações contendo tal matéria-prima vegetal, avaliando-se aspectos relacionados, principalmente, à estabilidade, toxicidade dérmica e atividade antifúngica *in vivo*.

Adicionalmente, este trabalho objetivou incorporar o óleo volátil em suspensões coloidais poliméricas do tipo nanocápsulas. Esta estratégia baseou-se na possibilidade de internalizar o óleo em vesículas nanoscópicas capazes, em hipótese, de protegê-lo da volatilidade, conferindo-lhe, melhor estabilidade. Esta suspensão foi, então, incorporada à base semi-sólida. As nanopátulas poliméricas têm despertado grande interesse na área farmacêutica, em virtude de suas inúmeras aplicações, destacando-se a vetorização de fármacos anticancerígenos e antibióticos, diminuição dos efeitos colaterais de alguns fármacos (antiinflamatórios não-esteróides), proteção de fármacos degradáveis no trato gastrintestinal (peptídeos, hormônios) e o controle da liberação de fármacos e aumento da biodisponibilidade ocular de determinadas substâncias (SCHAFFAZICK *et al.*, 2003).

Cabe ressaltar que não há estudos específicos sobre a otimização de formulações semi-sólidas contendo o óleo de capim-cidró, principalmente, em relação aos processos tecnológicos de sua obtenção e estabilidade, tão pouco a incorporação do óleo em suspensões de nanocápsulas, o que configura a originalidade desta proposta de desenvolvimento e controle de qualidade.

Dessa forma, pretende-se obter um medicamento alternativo e eficaz para o tratamento de infecções fúngicas cutâneas.

---

## **2. OBJETIVOS**



## 2.1 Objetivos gerais

O presente trabalho tem por objetivos gerais preparação, caracterização físico-química, avaliação da estabilidade e atividade biológica de formulações semi-sólidas contendo o óleo volátil de *Cymbopogon citratus*.

### 2.1.1 Objetivos específicos

- Avaliação da atividade antifúngica *in vitro* do óleo volátil e do citral frente a espécies do gênero *Candida*;
- Preparação de formulações semi-sólidas (emulsões e géis) contendo o óleo volátil de *C. citratus*;
- Preparação e caracterização de suspensões de nanocápsulas contendo o óleo volátil de *C. citratus*, e posterior incorporação em bases semi-sólidas;
- Avaliação das propriedades físico-químicas das formulações semi-sólidas desenvolvidas;
- Validação de método analítico para quantificação de citral no óleo volátil e nas formulações em estudo, por cromatografia líquida de alta eficiência;
- Avaliação da atividade antifúngica *in vitro* das formulações em estudo frente à levedura de *Candida albicans* e fungos dermatófitos (*Microsporum canis* e *Trichophyton rubrum*);
- Estudo da estabilidade das formulações;
- Avaliação *in vivo* e *in vitro* da irritação dérmica das formulações;

- Avaliação da atividade antifúngica *in vivo* das formulações em estudo frente à levedura de *Candida albicans*.



---

### **3. REVISÃO DE LITERATURA**



### 3.1 MICOSES SUPERFICIAIS

#### 3.1.1 Dermatomicoses

A pele e as mucosas são barreiras mecânicas efetivas a agentes externos, protegendo o organismo contra agentes infecciosos. É dividida em duas camadas distintas: a epiderme, camada mais superficial, contendo diferentes tipos de células, incluindo queratinócitos (células formadoras de queratina), células dendríticas (melanócitos e células de Langerhans) e células de Merkel, subdividida em quatro camadas: córnea, granular, espinhosa e basal; a derme, a qual consiste de tecido conjuntivo (fibras de colágeno, reticulina e elastina), contribuindo para a elasticidade da pele, bem como glândulas sebáceas, apócrinas e écrinas, altamente vascularizada e rica em terminações nervosas. Abaixo desta camada encontra-se a hipoderme (tecido subcutâneo), caracterizada pela presença de células de reserva de gordura. A epiderme, por apresentar células anucleadas e não ser vascularizada, atua como uma barreira protetora contra a perda de líquidos corporais e a penetração de algumas substâncias e microrganismos (PARKER, 1997; WILKINSON; MOORE, 1982).

A flora normal da pele apresenta cerca de  $10^3$  a  $10^4$  organismos/cm<sup>2</sup>, sendo predominante o *Staphylococcus epidermidis*, uma bactéria não patogênica à pele, mas que pode causar doenças quando atinge determinadas regiões. Além deste, *S. aureus*, *Corynebacterium*, *Streptococcus* spp., *Pseudomonas aeruginosa*. *Candida albicans* e *Malassesia furfur* estão, também, presentes, mas com menor frequência (HALL, 1999; LEVINSON; JAWETZ, 1998; SEVERO; LONDERO, 1996).

Alguns fungos patogênicos apresentam habilidade em infectar a camada superficial da pele, as unhas e o cabelo, causando infecções denominadas de dermatomicoses. Outros fungos podem invadir o tecido subcutâneo, causando infecções mais graves (micoses subcutâneas), resultando, em alguns casos, extensa destruição de tecidos (LACAZ *et al.*, 2002; MIMS *et al.*, 1995; PELCZAR *et al.*, 1996; SEVERO; LONDERO, 1996).

As lesões fúngicas produzidas na pele estão relacionadas a fatores como (MIMS *et al.*, 1995; SEVERO; LONDERO, 1996):

- traumas, causados por lesões acidentais (lacerações, queimaduras) ou intencionais (cirurgia), predispondo a infecção externa;
- manifestações cutâneas de infecções sistêmicas;
- lesões tóxicas da pele devido à produção de toxinas microbianas em um outro local do corpo.

A pele íntegra pode, também, ser infectada por dermatófitos, e fatores como a quantidade de fungos envolvida durante a exposição, a temperatura da pele, a composição química dos fluídos das glândulas sudoríparas e sebáceas, os fatores genéticos e raciais que tornam algumas pessoas mais propensas às infecções e a umidade da pele, contribuem para a proliferação destes patógenos (PELCZAR *et al.*, 1996; RUPKE, 2000). Condições que prejudicam a imunidade, como diabetes, infecções pelo vírus HIV e câncer, este último relacionado com à quimioterapia, aumentam o risco de infecções. Em adição, a utilização de corticosteróides, pode contribuir com a incidência de dermatomicoses (RUPKE, 2000; SEVERO; LONDERO, 1996).

As micoses superficiais encontram-se entre as infecções humanas mais comuns e as lesões produzidas, em geral, são brandas, não causando sérias complicações aos pacientes. Os principais agentes etiológicos responsáveis por estas infecções são os fungos dermatófitos dos gêneros *Epidermophyton*, *Microsporum* e *Trichophyton*. Além destes, algumas leveduras como *Candida spp.* e *Malassezia furfur* podem, também, estar associadas a estas doenças (ANAISSIE *et al.*, 2004; HALL, 1999; HOWARD; MILLER, 1996; LACAZ *et al.*, 2002; LAUBE, 2004; RUPKE, 2000; SEVERO; LONDERO, 1996).

Os dermatófitos são fungos que habitam o solo (geofílicos), o homem (antropofílicos) e os animais (zoofílicos), comumente transmitidos pelo contato direto

com pessoas, animais ou objetos inanimados contaminados. As infecções produzidas são conhecidas como tinhas (*tinea* ou *ringworm*), em virtude do aspecto apresentado por algumas lesões, semelhante a um anel, e, antigamente, acreditava-se que as lesões eram causadas por parasitas que assemelhavam-se a vermes (ANAISSIE *et al.*, 2004; HOWARD; MILLER, 1996; LACAZ *et al.*, 2002; LEVINSON; JAWETZ, 1998; PELCZAR *et al.*, 1996; SEVERO; LONDERO, 1996).

Estes fungos, após invadirem a pele, espalham-se radialmente na camada externa da epiderme, através de ramificações da hifa e artroconídios e, elaboram enzimas que são hábeis em digerir a queratina, proteína presente na camada externa da pele, causando escamações e destruição da pele, desintegração das unhas e queda dos cabelos. Além destas, as infecções são, também, caracterizadas por pruridos provocados por pápulas e vesículas pruriginosas, vermelhidão local, inchaço e inflamação. Em alguns pacientes, a presença de antígenos fúngicos circulantes dá origem à hipersensibilidade, mediada por fenômenos imunológicos na pele, conhecida como dermatofitides, por exemplo, vesículas nos dedos. Tais reações ocorrem em decorrência à resposta de antígenos fúngicos circulantes. Cabe salientar que, os dermatófitos, em virtude da afinidade apresentada pela queratina, não são capazes de invadir os tecidos vivos abaixo da camada queratinizada externa, resultando em infecções que não apresentam risco de vida aos pacientes, embora sejam bastante desagradáveis (HALL, 1999; LACAZ *et al.*, 2002; LEVINSON; JAWETZ, 1998; RUPKE, 2000; SEVERO; LONDERO, 1996).

As dermatomicoses encontram-se disseminadas em vários países, principalmente, em áreas tropicais e subtropicais, e viagens e migrações podem estar associadas à distribuição destas doenças (AL SOGAIR, 2000; ANAISSIE *et al.*, 2004; LACAZ *et al.*, 2002; LIPOZENCIC *et al.*, 2002; RUPKE, 2000). Cuidados especiais no que se refere à higiene pessoal, contato com animais domésticos ou crianças infectadas, especialmente em escolas, devem ser realizados, a fim de evitar possíveis infestações. Na pele, as lesões são caracterizadas pela presença de vesículas e pústulas e, em casos mais graves, pode espalhar-se para outras partes do corpo,

resultando em lesões bastante inflamadas, caracterizadas pela formação de anéis eritematosos (AL SOGAIR, 2000; ANAISSIE *et al.*, 2004; RUPKE, 2000).

Cabe salientar que, o desenvolvimento de infecções fúngicas na pele pode ocasionar a incidência de bactérias contaminantes, agravando-se, desta forma, os quadros lesionais, especialmente, em crianças, as quais são mais suscetíveis às infecções (LIPOZENCIC *et al.*, 2002).

As lesões são divididas em diferentes categorias, de acordo com o local infectado pelo fungo: *Tinea capitis*, afeta o cabelo e a pele do couro cabeludo; *Tinea corporis*, o corpo; *Tinea pedis*, os pés; *Tinea faciei*, a face; *Tinea manuum*, as mãos; *Tinea cruris*, a virilha e *Tinea barbae*, a barba. As infecções provocadas nas unhas são denominadas de onicomicoses (*Tinea unguium*) (ANAISSIE *et al.*, 2004; HALL, 1999; LACAZ *et al.*, 2002; LAUBE, 2004).

O número de espécies causadoras de infecções é bastante variado, dependendo da região em que se encontram; entretanto, algumas são predominantes e disseminadas por vários países. Na Tabela 3.1 encontram-se descritas as principais espécies de fungos dermatófitos existentes no continente Americano, de acordo com sua classificação ecológica (SEVERO; LONDERO, 1996).

**TABELA 3.1** – Ecologia e incidência dos dermatófitos no continente Americano.

<b>Agentes mais freqüentes</b>		
<b>Antropofílicos</b>	<b>Zoofílicos</b>	<b>Geofílicos</b>
<i>E. floccosum</i>	<i>M. canis</i> var. <i>canis</i>	
<i>T. mentagrophytes</i> var. <i>interdigitale</i>	<i>T. mentagrophytes</i> var. <i>mentagrophytes</i>	
<i>T. rubrum</i>		
<i>T. tonsurans</i>		
<b>Agentes menos freqüentes</b>		
<b>Antropofílicos</b>	<b>Zoofílicos</b>	<b>Geofílicos</b>
<i>M. audounii</i>	<i>T. verrucosum</i>	<i>M. gypseum</i> var. <i>falvum</i>
<i>T. concentricum</i>		
<i>T. shoenleinii</i>		
<i>T. violaceum</i>		

*Tinea capitis* é uma dermatomicose que ocorre, preferencialmente, em crianças, sendo causada pelos fungos dos gêneros *Microsporum* e *Trichophyton*. Além da pele, estes fungos podem comprometer o cabelo, pela produção de artroconídios no interior do fio (endotrix), lesão causada, principalmente, pelo *T. tonsurans*, e na superfície externa (exotrix), infecção que inicia como endotrix, mas se estende na cutícula do fio de cabelo e forma uma massa de artroconídios. O principal agente causador desta infecção é o *M. canis* (AL SOGAIR, 2001; LACAZ *et al.*, 2002). Em alguns casos, pode ocorrer alopecia e intensa reação inflamatória, bem como lesões de quérion, caracterizadas por placa elevada, pruriginosa e dolorida, de aspecto esponjoso (HAINER, 2003; LAUBE, 2004; SEVERO; LONDERO, 1996). É uma doença altamente contagiosa, espalhando-se rapidamente numa família ou numa comunidade escolar (AL SOGAIR, 2001; SEVERO; LONDERO, 1996).

Uma variedade de *Tinea capitis* é a *Tinea favosa*, conhecida como “favus”. É uma doença rural, relacionada à falta de hábitos de higiene e má nutrição. Geralmente, afeta grupos de famílias e é caracterizada por massas densas de micélio e

fragmentos epiteliais, formando crostas amareladas. Após um longo período, ocorre atrofia da pele, levando à alopecia. Tal enfermidade é causada, especialmente, pelo *M. gypseum* e *T. schoenleinii* (AL SOGAIR, 2001; LACAZ *et al.*, 2002; SEVERO; LONDERO, 1996).

Dentre as diversas micoses causadas pelos fungos dermatófitos, algumas são bastante conhecidas e comuns entre os indivíduos, dentre elas, a infecção denominada de “pé de atleta” (tipo intertriginosa), atingindo uma parcela bastante significativa da população mundial. A principal causa deste tipo de *Tinea pedis* é a umidade, sendo mais comum em adultos, em especial do sexo masculino. Esta infecção atinge a região interdigital, em geral, entre o terceiro, quarto e quinto dedos dos pés, caracterizada por maceração, escamações e fissuras; um segundo tipo de *Tinea pedis* é a seca, denominada de “mocasin” (tipo escamosa), com extensa hiperqueratinização, ocorrendo na parte plantar dos pés, causada, principalmente, pelo *T. rubrum*, e, por último, do tipo vesicular, semelhante a uma dermatite de contato aguda, menos comum, sendo o *T. mentagrophytes* seu principal agente etiológico. Além dos fungos causadores destas doenças infecciosas (*E. floccusum*, *T. mentagrophytes*, *T. tonsurans* e *T. rubrum*), algumas bactérias poderão, também, estar envolvidas nestas patologias (ANAISSIE *et al.*, 2004; HAINER, 2003; HALL, 1999; RUPKE, 2000; SEVERO; LONDERO, 1996; WEINSTEIN; BERMAN, 2002).

*Tinea corporis*, conhecida como “ringworm” do corpo, relaciona-se a infecções produzidas no tronco e nos membros, excluindo regiões palmoplantares, ínguino-axilar e espaços interdigitais. As lesões produzidas são caracterizadas por placas anulares, únicas ou múltiplas, limitadas por bordas eritematosas (HAINER, 2003; LACAZ *et al.*, 2002; LAUBE, 2004; SEVERO; LONDERO, 1996; WEINSTEIN; BERMAN, 2002). Dentre as espécies mais comuns responsáveis por estas infecções encontram-se *Trychophyton* e *Microsporum* (ANAISSIE *et al.*, 2004; LACAZ *et al.*, 2002; RUPKE, 2000). *Tinea imbricata* é a forma não usual de *Tinea corporis*, causada pelo *T. concentricum* (ANAISSIE *et al.*, 2004; WEINSTEIN; BERMAN, 2002) e ocorre em certas



populações indígenas do Oceano Pacífico, México, Guatemala e Brasil (LACAZ *et al.*, 2002; SEVERO; LONDERO, 1996).

Um outro tipo de dermatomicose, mais freqüente em homens adultos, denomina-se *Tinea cruris*. As lesões localizam-se na parte superior das coxas, nas regiões púbica, perianal e dobras glúteas, causadas, principalmente, pelo *E. floccosum*, *M. canis*, *T. mentagrophytes* e *T. rubrum* (ANAISSIE *et al.*, 2004; LACAZ *et al.*, 2002; SEVERO; LONDERO, 1996). Este tipo de dermatomicose geralmente está associada com *Tinea pedis*, e a elevada temperatura e umidade, bem como a oclusão do escroto e da área da virilha, favorecem a sua ocorrência (ANAISSIE *et al.*, 2004; HAINER, 2003; SEVERO; LONDERO, 1996).

*Tinea barbae* afeta, restritamente, homens adultos, em geral, provenientes de áreas rurais, sendo o *T. mentagrophytes var. mentagrophytes* e o *T. verrucosum* seus principais agentes (ANAISSIE *et al.*, 2004; SEVERO; LONDERO, 1996). A infecção atinge as áreas da barba e pescoço, e a transmissão ocorre, em geral, pelo contato com organismos zoofílicos, ou devido às más condições de higiene, transmitindo de uma pessoa para a outra (ANAISSIE *et al.*, 2004; HAINER, 2003). As lesões são de três tipos: superficial, com eritema difuso e área de pústulas perifoliculares; inflamatória e profunda, com nódulos confluentes, formando placas infiltradas com abscessos centrados por pêlos. Em alguns casos, bactérias poderão estar associadas (ANAISSIE *et al.*, 2004; SEVERO; LONDERO, 1996).

*Tinea faciei* é uma infecção que afeta, usualmente, adultos, distribuindo-se pelo dorso do nariz e estendendo-se à face, caracterizada como “asa de borboleta”, semelhante a lúpus eritematoso (HAINER, 2003; SEVERO; LONDERO, 1996).

A prevalência de dermatomicoses em pacientes da região metropolitana de Porto Alegre/RS foi demonstrada em um estudo realizado por MEZZARI (1998), durante o período de junho de 1981 a junho de 1995, no qual diferentes espécies de dermatófitos foram isolados de amostras de pele, pêlos e unhas, de indivíduos de ambos os sexos e diferentes classes sociais, num total de 864 amostras. Neste estudo,

observou-se o predomínio de *T. rubrum* (55,33% dos casos), seguido de *T. mentagrophytes* (21,46%), *M. canis* (12,09%), *E. floccosum* (5,47%), *T. tonsurans* (2,44%), *M. gypseum* (1,96%) e *T. violaceum* (0,44%). Comparando-se os resultados obtidos com outros coletados em populações do interior do Estado, num período de 32 anos (1960-1992), outras espécies foram encontradas (*T. verrucosum*, *M. nanum*, *T. simii*, *M. persicolor*, *T. shoenleinii* e *M. cookei*), diferindo-se das relatadas na capital.

FOSTER e colaboradores (2004) avaliaram a incidência de espécies fúngicas responsáveis por infecções cutâneas nos Estados Unidos. Neste estudo, 15.381 amostras foram coletadas de pacientes com *Tinea corporis*, *Tinea cruris*, *Tinea capitis*, *Tinea faciei*, *Tinea pedis*, *Tinea manuum* e onicomicoses, no período de 1999 a 2002. Dentre as espécies de fungos dermatófitos, *T. rubrum* foi o agente mais freqüente nos casos de onicomicoses, *Tinea corporis*, *Tinea cruris*, *Tinea manuum* e *Tinea pedis*. Em pacientes com *Tinea capitis*, observou-se um aumento da incidência de *T. tonsurans*. Nos casos clínicos de onicomicoses, verificou-se, também, a prevalência de *Candida* spp. (maior que 70%), sendo a *C. albicans* responsável por 47,9% de 54% das culturas positivas.

### 3.1.1.1 Tratamento das dermatomicoses

As pesquisas relacionadas ao desenvolvimento de agentes antifúngicos iniciaram-se há, aproximadamente, 50 anos, sendo a nistatina descoberta por Brown e Hazen em 1949 e licenciada para o tratamento de candidíases superficiais (mucosas), em 1951 (ANDRIOLE, 2000). Em 1956, Gold e colaboradores demonstraram as propriedades antifúngicas da anfotericina B e, em 1958, a griseofulvina foi o primeiro fármaco empregado no tratamento oral de micoses superficiais (GUPKA *et al.*, 1994). Na década de 70, foram introduzidos os derivados imidazólicos (clotrimazol, miconazol e cetoconazol) e os derivados triazólicos têm sido estudados desde os anos 80, juntamente com outras substâncias bastante promissoras, como as alilaminas (GUPKA *et al.*, 1994; RUPKE, 2000).

As micoses superficiais são tratadas, tradicionalmente, com agentes antifúngicos tópicos, de amplo espectro e seguros. Em alguns casos, o tratamento é um pouco dificultado, muitas vezes, em função do uso de cosméticos no local lesionado, juntamente com o medicamento, e aplicações freqüentes (CREVITS *et al.*, 1998; MURDAN, 2002). Em casos de reincidência de *Tinea capitis* e em pacientes imunodeprimidos, em especial, aids, a terapia oral é requerida (LAUBE, 2004). Além disso, em algumas patologias, a terapia tópica não é satisfatória, pois os fármacos empregados nas preparações tópicas apresentam baixa penetrabilidade nos queratinócitos, sendo, em determinadas situações, substituídos pelos medicamentos orais (CREVITS *et al.*, 1998; MURDAN, 2002).

Os fungos são organismos eucariotos e sua membrana plásmática é caracterizada pela presença de ergosterol, que é o componente alvo de ação da maioria dos fármacos antifúngicos. As principais classes de fármacos utilizados no tratamento de dermatomicoses compreendem (ANDRIOLE, 2000; DiDOMENICO, 1999; ODDS *et al.*, 2003; RUPKE, 2000):

- polienos (nistatina, anfotericina B): agem complexando com o ergosterol, ocorrendo a destruição da membrana plasmática, resultando em um aumento da permeabilidade da membrana, extravazamento do conteúdo citoplasmático e morte celular;
- derivados imidazólicos (cetoconazol, miconazol, econazol) e triazólicos (itraconazol, fluconazol): agem pela inibição da enzima citocromo P-450-dependente-14- $\alpha$ -demetilase, a qual é responsável pela conversão de lanosterol em ergosterol, diminuindo, desta forma, as concentrações de ergosterol na membrana celular;
- alilaminas (terbinafina, naftifina): constituem uma classe de compostos antifúngicos sintéticos, com atividade tópica e oral, atuam inibindo, seletivamente, a esqualeno epoxidase, enzima chave na biossíntese de ergosterol.

Os derivados imidazólicos são usualmente empregados no tratamento de micoses superficiais, com algumas limitações: cetoconazol apresenta sérios problemas de hepatotoxicidade, além de causar náusea, anorexia e constipação, preferindo-se, desta forma, outros derivados sintéticos, como fluconazol, mais tolerado e eficaz no tratamento de *Tinea corporis*, *Tinea cruris*, *Tinea pedis* ou candidíase cutânea, conforme pesquisas relatadas (CREVITS *et al.*, 1998).

A descoberta de fármacos mais efetivos e seguros, como o itraconazol o fluconazol e a terbinafina, contribuiu, significativamente, no tratamento das micoses superficiais, principalmente, pela sua eficácia na administração oral, redução dos efeitos adversos e diminuição do período de tratamento (De DONKER, 1999; RUPKE, 2000).

Na Tabela 3.2 estão listadas algumas substâncias empregadas no tratamento de infecções fúngicas causadas por dermatófitos, assim como algumas considerações relativas ao uso destes fármacos.

Em pacientes que apresentam reações inflamatórias, como eritema e prurido, a combinação de agentes antifúngicos com corticosteróides pode ser utilizada (WEINSTEIN; BERMAN, 2002).

Medidas não farmacológicas, como adequados hábitos de higiene, uso de roupas de algodão ou ausência de materiais sintéticos oclusivos e secagem das áreas infectadas após limpeza são recomendados (WEINSTEIN; BERMAN, 2002).

**TABELA 3.2** – Fármacos antifúngicos empregados no tratamento de dermatomicoses.

<b>Substância</b>	<b>Considerações</b>
Anfotericina B	Fungicida; amplo espectro de ação; uso oral e tópico; baixa resistência; nefrotoxicidade associada ao tratamento, pouco utilizada para dermatomicoses
Nistatina	Uso tópico e oral; mais empregada no tratamento de candidíase
Bifonazol Cetoconazol Clotrimazol Econazol Miconazol Oxiconazol Sertaconazol Sulconazol	Uso oral e tópico; atividade contra leveduras, dermatófitos e fungos dimórficos; ação fungistática, geralmente  Miconazol: bastante empregado topicamente nas micoses superficiais  Cetoconazol: muito utilizado, atualmente, substituído por outros derivados
Fluconazol Itraconazol	Amplo espectro de ação, incluindo <i>Aspergillus</i> spp.; atividade contra <i>C. albicans</i> e cepas não-albicans, e dermatófitos; efetivos em modelos de imunodepressão; uso oral e tópico
Amorolfina Butenafina Terbinafina	Fármacos empregados no tratamento de dermatomicoses, em especial, onicomicoses; terbinafina uso oral e tópico; ação fungicida
Ciclopirox	Uso tópico, dermatófitos e candidíases; também, bactericida gram+/-; usado na forma de lamina
Griseofulvina	Uso oral
Tolnaftato Haloproquina	Uso tópico; em associações com antibióticos, corticosteróides e outros antifúngicos

Fonte: ANDRIOLE, 2000; CONTET-AUDONNEAU; SCHMUTZ, 2001; DiDOMENICO, 1999; LACAZ *et al.*, 2002; RUPKE, 2000; WEINSTEIN; BERMAN, 2002.

### 3.1.1.2 Onicomicoses

As onicomicoses referem-se às infecções fúngicas superficiais que afetam as unhas das mãos e dos pés, também conhecidas como *Tinea unguium*. Tais infecções são causadas por fungos dermatófitos (cerca de 90-95% dos casos), bem como algumas espécies de leveduras (ANAISSIE *et al.*, 2004; MURDAN, 2002; RODGERS; BASSLER, 2001). As principais espécies de fungos dermatófitos

responsáveis por esta patologia são *T. rubrum*, especialmente, *T. mentagrophytes* e *E. floccosum* (ANAISSIE *et al.*, 2004).

Estas infecções ocorrem mais comumente em adultos, atingindo cerca de 2 a 14% da população, afetando, principalmente, as unhas dos pés. O uso de calçados fechados por um longo período de tempo, a umidade e a disseminação de diferentes cepas de fungos existentes no mundo, contribuem para o aumento da incidência destas infecções (MURDAN, 2002; RODGERS; BASSLER, 2001). Além destes, fatores como idade avançada, diabetes, traumas nas unhas, hiperidrose, doenças vasculares periféricas, má higiene e imunodeficiência predispõem às infecções (ANAISSIE *et al.*, 2004; RODGERS; BASSLER, 2001). Com o constante aumento de pacientes com Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (SIDA), a frequência de casos de onicomicoses, bem como outras infecções fúngicas, tem aumentado (ANAISSIE *et al.*, 2004; MURDAN, 2002).

As onicomicoses são, também, consideradas como um problema estético, pois além do desconforto causado pela patologia, ocorre a deformação da unha, causando um aspecto disforme e desagradável, bem como possíveis contaminações entre os indivíduos (RODGERS; BASSLER, 2001).

As onicomicoses podem ser classificadas, de acordo com o local da unha infectado, em (ANAISSIE *et al.*, 2004; CONTET-AUDONNEAU; SCHMUTZ, 2001; LACAZ *et al.*, 2002; LAUBE, 2004; MURDAN, 2002; RODGERS; BASSLER, 2001):

- onicomicose distal e subungueal lateral: é a mais comum das infecções, desenvolvida nas unhas das mãos e dos pés, causada, principalmente, *pelo T. rubrum*, que invade a primeira camada da unha e a região plantar;
- onicomicose superficial branca: ocorre em cerca de 10% dos casos, na qual o fungo invade a camada superficial da região plantar da unha e forma pontos opacos brancos nas unhas, podendo se espalhar por toda a região; o agente etiológico, em geral, envolvido com este tipo de infecção é o *T. mentagrophytes var. interdigitale*;

- onicomicose subungueal proximal: é a forma menos comum de *Tinea unguium*, causada, na maioria dos casos, pelo *T. rubrum*, que afeta, principalmente, pacientes imunodeprimidos; neste tipo, o fungo invade a unha na região proximal, penetra na região plantar e migra distalmente;
- onicomicose candidal: desenvolvida, especialmente, em pacientes com candidíase mucocutânea crônica, nos quais, espécies de *Candida* podem invadir as unhas;
- onicomicose distrófica total: caracterizada pela destruição total da unha, compreendendo o resultado final de todas as formas de onicomicoses.

A incidência de onicomicoses em crianças é baixa, cerca de 0,2%, ocorrendo, principalmente, em pacientes imunodeprimidos (infectados pelo HIV, quimioterapia e síndromes de imunodeficiências congênitas), em indivíduos com casos de onicomicoses na família ou em pacientes com outras micoses cutâneas, como *Tinea capitis* e *Tinea pedis* (RODGERS; BASSLER, 2001; STEFANAKI *et al.*, 2002).

O tratamento das onicomicoses é longo, incluindo a utilização de medicamentos de uso tópico e oral. Antigamente, a administração oral de griseofulvina ou cetoconazol era a terapia de escolha; entretanto, em virtude do longo período de tratamento, da incidência de efeitos adversos, aliado à reincidência das infecções, estes fármacos são pouco utilizados (ANAISSIE *et al.*, 2004; De DONCKER, 1999; RODGERS; BASSLER, 2001).

Atualmente, o tratamento das onicomicoses tem melhorado substancialmente, pois novos fármacos mais efetivos estão sendo introduzidos na terapia oral. Os derivados triazólicos e as alilaminas foram introduzidos em substituição à griseofulvina e o cetoconazol. Esses fármacos apresentam altas taxas de cura e menos recidivas, contribuindo, desta forma, para a cura das infecções (De DONCKER, 1999; MURDAN, 2002; RODGERS; BASSLER, 2001).

Dentre os principais medicamentos recomendados para o tratamento das onicomicoses, a terbinafina, o itraconazol, estes mais empregados, e o fluconazol, são

os mais efetivos, pois apresentam imediata penetração na unha, podendo permanecer por meses após a interrupção da terapia e, geralmente, bastante seguros. Segundo o Food and Drug Administration (FDA), a dosagem e o período de tratamento para alguns medicamentos compreendem: terbinafina – dose diária de 250 mg, durante três meses; itraconazol – 200 mg diários, durante três a quatro meses, ou terapia de pulso, sendo que, durante uma semana de cada mês deve-se administrar, 200 mg, duas vezes ao dia, garantindo, desta forma, a eficácia do tratamento. O sucesso no tratamento com estes fármacos tem sido satisfatório, atingindo a cura de, aproximadamente, 80% dos casos. O crescimento das unhas ocorre de maneira lenta, podendo levar, em alguns pacientes, mais de um ano para restaurar, totalmente, a unha afetada (ANAISSIE *et al.*, 2004; CONTET-AUDONNEAU; SCHMUTZ, 2001; De DONCKER, 1999; LACAZ *et al.*, 2002; MURDAN, 2002; RODGERS; BASSLER, 2001).

A terapia com terbinafina e itraconazol para o tratamento de onicomicoses é um pouco onerosa para alguns pacientes, causando, muitas vezes, devido à interrupção, insucesso no tratamento e novas infecções. Em alguns casos, apesar da hepatotoxicidade apresentada pelo uso prolongado de cetoconazol, prefere-se utilizá-lo em função do menor custo.

O fluconazol não constitui a terapia de escolha recomendada pelo FDA para o tratamento de onicomicoses, mas por sua alta eficácia, em determinadas situações é empregado, especialmente, em pacientes imunodeprimidos. A dose usual compreende a administração oral de 150 mg uma vez por semana, durante seis a nove meses (ANAISSIE *et al.*, 2004; LACAZ *et al.*, 2002; RODGERS; BASSLER, 2001).

A terapia sistêmica de medicamentos antifúngicos apresenta algumas desvantagens, como a ocorrência de efeitos adversos e interações com outras substâncias. Testes de monitoramento das funções hepáticas na terapia continuada com terbinafina e derivados triazólicos são recomendados (MURDAN, 2002; RODGERS; BASSLER, 2001). Apesar destes aspectos, em algumas patologias, como onicomicoses do tipo plantar, a terapia tópica é insuficiente, atingindo um número limitado de unhas, ocasionando insucesso no tratamento (De DONCKER, 1999).



Além da administração oral, a utilização de medicamentos tópicos na forma de cremes, esmalte e pós pode ser empregada, especialmente em pacientes com *Tinea pedis* concomitante (ANAISSIE *et al.*, 2004; RODGERS; BASSLER, 2001). Em virtude da alta queratinização da unha, a difusão do fármaco, administrado topicamente, é dificultada, necessitando um longo período de tratamento. Desta forma, a terapia tópica é recomendada em casos iniciais da doença, em geral, quando não mais que duas unhas foram afetadas, ou quando a terapia oral é contra-indicada (De DONCKER, 1999; MURDAN, 2002). O mais conveniente é utilizar preparações tópicas na forma de esmaltes contendo os fármacos antifúngicos, dentre eles o ciclopirox, aplicando-se o produto na região plantar da unha, com auxílio de um pincel, por doze meses (ANAISSIE *et al.*, 2004; RODGERS; BASSLER, 2001). Outras formas farmacêuticas são, também, comercializadas: solução de tioconazol e ácido salicílico, aplicadas na unha, por períodos de seis a doze meses de tratamento (MURDAN, 2002).

Para evitar reinfecções, sugere-se a adequada higiene dos pés (usar meias de algodão, proteger os pés em áreas de banho, secar corretamente, tratar qualquer tipo de infecção instalada) e controlar certas doenças, como diabetes (ANAISSIE *et al.*, 2004; RODGERS; BASSLER, 2001).

### **3.1.2 Candidíases superficiais**

As condições normais da pele e dentre elas, a relativa falta de umidade na maioria das regiões, limita o crescimento de fungos e leveduras; ao contrário, uma pele úmida proporciona a ocorrência de infecções, dentre elas, candidíases (MIMS *et al.*, 1995).

As candidíases são infecções causadas por leveduras do gênero *Candida*, sendo a *Candida albicans* responsável pela maioria das doenças existentes. As infecções podem ocorrer na boca, na vagina, na pele, nas unhas, no pulmão, no trato gastrointestinal e, ocasionalmente, ocorre a descrição de septicemias (ANAISSIE *et al.*,

2004; HALL, 1999; HOWARD; MILLER, 1996; LACAZ *et al.*, 2002; RUPKE, 2000; WARREN; HAZEN, 1999).

A *Candida* spp. faz parte da flora normal do homem, encontrada em pequena quantidade na pele sadia e intacta, nas mucosas oral e vaginal; entretanto, pode, rapidamente, colonizar a pele danificada e o seu supercrescimento, pode resultar em doenças locais. As infecções, em geral, afetam a pele, as unhas e as membranas mucosas (ANAISSIE *et al.*, 2004; MIMS *et al.*, 1995; RUPKE, 2000; SEVERO; LONDERO, 1996). Em pacientes debilitados ou imunodeprimidos, espécies de *Candida* podem invadir os tecidos subcutâneos mais profundos, disseminando-se para diversos locais do organismo, causando tromboflebite, endocardite ou infecção ocular e de outros órgãos (HALL, 1999; MIMS *et al.*, 1995; WARREN; HAZEN, 1999). O desenvolvimento de candidíase nos tratos orofaríngeal e genitourinário é freqüente em pacientes infectados com o vírus HIV (LONDOÑO *et al.*, 1998).

As infecções cutâneas produzidas por *Candida* spp. podem ocorrer em indivíduos saudáveis ou naqueles com redução das funções imunológicas, e fatores como baixa imunidade, doenças sistêmicas (diabetes, hipotireoidismo, câncer) e administração de fármacos imunossupressivos, anticoncepcionais, antibióticos de amplo espectro e corticosteróides predispõem às infecções (ANAISSIE *et al.*, 2004; LAUBE, 2004; RUPKE, 2000).

Conforme descrito anteriormente, a *Candida albicans* é um importante patógeno causador de infecções humanas e diversos fatores de virulência promovem o sucesso de seu parasitismo (CALDERONE; FONZI, 2001; WARREN; HAZEN, 1999). Além disso, uma característica importante apresentada por esta levedura é sua versatilidade e habilidade em colonizar a flora normal, em locais distintos, ao contrário de alguns microrganismos, como a *E. coli*. Determinadas condições fisiológicas extremas, como o pH, não impedem a adaptação de *Candida*, uma vez que a expressão de gens pelo microrganismo, proporciona sua adaptação em condições neutras de pH (gen PHR1) e ácidas (gen PHR2), no caso da mucosa vaginal (CALDERONE; FONZI, 2001).

As espécies de *Candida* são oportunistas, e alterações nas condições normais do sistema imunológico favorecem o surgimento de infecções. Os fatores de virulência que contribuem para a patogenicidade de *C. albicans* compreendem: rápida germinação no tecido, ligação a células do hospedeiro, produção de proteases e fosfolipases, adesão às proteínas da matriz extracelular, rearranjos cromossômicos e variações morfológicas (transição reversível entre células unicelulares e filamentosas) (CALDERONE; FONZI, 2001; WARREN; HAZEN, 1999).

### 3.1.2.1 Candidíases cutâneas

A forma mais comum das candidíases cutâneas é a intertriginosa, caracterizada por maceração e escamação entre as dobras da pele, e as lesões são, geralmente, eritematosas, com pústulas satélites e pruridos, com intensa irritação, causando um grande desconforto para o paciente (ANAISSIE *et al.*, 2004; HALL, 1999; RUPKE, 2000). Os locais afetados são, principalmente, as partes quentes e úmidas do corpo, e as infecções podem ser (ANAISSIE *et al.*, 2004; HALL, 1999; LACAZ *et al.*, 2002; LEVINSON; JAWETZ, 1998; RUPKE, 2000):

- Intertrigosa: axilas, virilha, dobras da pele (região inframamária), mais comum das patologias, caracterizada por áreas demarcadas de eritema e maceração, com pápulas satélites e pústulas;
- Interdigital: infecção crônica com maceração tecidual, que atinge o espaço entre os dedos, especialmente entre o centro e o anel do dedo;
- Rash cutâneo (erupções): lesões que ocorrem em crianças, na região perianal, podendo se espalhar por toda a genitália e interior das coxas;
- Perianal (região anal): caracterizada por eritema e maceração, com prurido e intensa ardência;
- Ínguino-crural: na glândula peniana e virilha, com múltiplas pústulas e eritema difuso;

- Foliculite: qualquer área do corpo com cabelos, com a formação de pequenas pústulas na base dos folículos.

A imersão prolongada das mãos em água pode contribuir com o surgimento de infecções produzidas nos espaços interdigitais dos dedos, sendo mais comum em cozinheiras, donas de casa, manipuladores de peixes, entre outros (ANAISSIE *et al.*, 2004; HALL, 1999; LEVINSON; JAWETZ, 1998). A obesidade constitui outro fator de predisposição às candidíases cutâneas, devido à dificuldade em manter a pele seca entre as camadas de gordura (ANAISSIE *et al.*, 2004; HALL, 1999). Infecções causadas por *C. parapsilosis* é comum em trabalhadores da área da saúde (ANAISSIE *et al.*, 2004).

Existem outros tipos de infecções cutâneas causadas pela *Candida* spp., mas menos frequentes, como: candidíase cutânea generalizada, caracterizada pelo espalhamento de erupções da pele, com vesículas que podem afetar as regiões genitais, a virilha e região anal, bem como o tronco e extremidades (mãos e pés), podendo ocorrer em adultos e crianças (ANAISSIE *et al.*, 2004; HALL, 1999); granulomas, que são lesões extensas, secas, com hiperqueratinização, as quais ocorrem espontaneamente na pele de indivíduos com candidíase mucocutânea crônica; candidíase disseminada, é rara e grave, associada com outras lesões na pele, proveniente de infecções do sangue que afetam a pele; e candidíase cutânea congênita, também, denominada de candidíase neonatal, causada em recém-nascidos, principalmente crianças prematuras, nas quais a doença desenvolve-se rapidamente, podendo progredir e causar infecção disseminada (ANAISSIE *et al.*, 2004; LACAZ *et al.*, 2002).

O tratamento destas doenças é realizado através da administração tópica de fármacos antifúngicos, aplicados no local afetado, uma a duas vezes ao dia, dependendo do medicamento empregado. Dentre as substâncias disponíveis para terapia pode-se citar: anfotericina B (creme, loção, pomada), butenafina e terbinafina (creme), cetoconazol, clotrimazol, econazol, miconazol (creme, pó, *spray*) e nistatina (creme, pomada, pó) (ANAISSIE *et al.*, 2004; CONTET-AUDONNEAU; SCHMUTZ,

2001; LACAZ *et al.*, 2002). A utilização tópica de corticosteróides, durante poucos dias, pode auxiliar no tratamento; entretanto, o emprego destas substâncias pode favorecer a ocorrência de infecções (ANAISSIE *et al.*, 2004).

A nistatina é utilizada no tratamento de diversos tipos de infecções causadas pela *Candida* spp. (muco-cutâneas, genital e do trato digestivo) (ANDRIOLE, 2000; CONTET-AUDONNEAU; SCHMUTZ, 2001). Os derivados azólicos são, também, bastante empregados, apresentando ação para diferentes espécies de *Candida*, dentre elas *C. albicans*, *C. neoformans*, *C. immitis* e *C. glabrata* (ANDRIOLE, 2000).

A administração oral de fármacos antifúngicos, em determinadas situações, é recomendada, como a nistatina, no tratamento de *rash* em crianças, com o objetivo de reduzir a colonização da *Candida*, bem como sua recolonização na região perianal. O uso de derivados triazólicos (itraconazol, fluconazol) na terapia sistêmica é, ocasionalmente, indicado, em especial para pacientes com doenças bastante graves (imunodeprimidos) e com dificuldade em controlar alguns fatores de predisposição, como diabetes (ANAISSIE *et al.*, 2004; HALL, 1999; LAUBE, 2004).

Com o objetivo de auxiliar no tratamento e evitar possíveis infecções, a adequada higiene do corpo é indicada, evitando-se oclusões, as quais prejudicam a secagem, além de realizar uma boa limpeza do local afetado (ANAISSIE *et al.*, 2004; LAUBE, 2004).

### **3.1.2.2 Onicomicoses causadas por *Candida* spp.**

Onicomicoses causadas por *Candida* spp. estão, também, presentes em alguns pacientes. Manifestam-se, inicialmente, por paroníquia (tumefação eritematosa e dolorida dos tecidos periungueais, com gotículas de pus). Após, surge oníquia (erosão da borda ungueal, estendendo-se pela lâmina ungueal, tornando-se espessa e escurecida) (RODGERS; BASSLER, 2001; SEVERO; LONDERO, 1996). Estima-se que cerca de 50% dos casos de onicomicoses nas unhas dos pés estão relacionados com a

presença de espécies de *Candida* (ANAISSIE *et al.*, 2004). Pacientes com candidíase mucocutânea crônica podem desenvolver infecções nas unhas (ANAISSIE *et al.*, 2004; RODGERS; BASSLER, 2001).

A incidência das infecções está, também, associada às condições climáticas e determinados costumes de algumas regiões, como por exemplo, verificou-se um aumento de onicomicoses causadas por *Candida* spp. na Arábia Saudita, atribuindo-se este fato à prática exercida pelos religiosos de lavarem os pés cinco vezes ao dia (ANAISSIE *et al.*, 2004).

A *C. albicans* é o agente etiológico responsável pela maioria das infecções; entretanto, algumas espécies não-albicans têm sido relatadas, como *C. parapsilosis*, *C. krusei* e *C. guilliermondii* (ANAISSIE *et al.*, 2004; CONTET-AUDONNEAU; SCHMUTZ, 2001).

O tratamento empregado para onicomicoses causadas por *Candida* spp. é bastante semelhante ao utilizado para os dermatófitos. Os derivados imidazólicos e triazólicos apresentam boa eficácia quando administrados oralmente, sendo o fluconazol mais efetivo no tratamento de candidíases, em relação às dermatomicoses (ANDRIOLE, 2000; CONTET-AUDONNEAU; SCHMUTZ, 2001). Além destes, terbinafina e itraconazol apresentam boa eficácia para diversas espécies de *Candida* (RODGERS; BASSLER, 2001). A administração tópica é, também, recomendada, e dentre os fármacos empregados pode-se citar: cetoconazol, econazol, ciclopirox, amorolfina, entre outros (CONTET-AUDONNEAU; SCHMUTZ, 2001).

### 3.1.2.3 Vulvovaginites

A flora normal da vagina é caracterizada pela presença de algumas bactérias, como *Streptococcus*, *Staphylococcus*, bacilos de *Döderlein*, diferóides e, não raramente, leveduras do gênero *Candida*. Em determinadas situações, pode ocorrer a proliferação de algum microrganismo, ocasionando o aparecimento de doenças.

Fatores como o conteúdo de células epiteliais e de glicose, o pH, os níveis hormonais, os possíveis traumas decorrentes da atividade sexual e a idade, afetam a prevalência de determinados microrganismos na flora vaginal (NOVAK, 1983; SIMONETTI, 1996).

A *C. albicans* é o mais freqüente colonizador e responsável pela maioria das infecções vaginais, cerca de 80 a 90% dos casos; entretanto, outras espécies de *Candida* são, também, relacionadas, como *C. tropicalis*, *C. lusitaniae*, *C. parapsilosis* e *C. guilliermondii* (ANAISSIE *et al.*, 2004; PALACÍN *et al.*, 2000; TORRES *et al.*, 2000). Tais infecções podem ocorrer em mulheres sadias e a incidência das doenças está relacionada com: uso de antibióticos de amplo espectro, diminuindo a flora normal, fazendo com que ocorra a proliferação de algumas espécies, gravidez, diabetes e infecções pelo HIV (ANAISSIE *et al.*, 2004; HALL, 1999; LEVINSON; JAWETZ, 1998).

*Candida glabrata*, atualmente, tem uma importante participação em casos de vulvovaginites. A incidência de espécies não-albicans nestas infecções, pode estar relacionada ao curto período de tratamento da terapia oral ou tópica, resultando em eliminação da espécie mais sensível (*C. albicans*) e a seleção de espécies mais resistentes. Além disso, *C. glabrata* apresenta uma baixa resposta aos derivados azólicos (ANAISSIE *et al.*, 2004).

Candidíase vaginal é cerca de 10 a 20% mais freqüente em mulheres grávidas, sendo, em alguns casos, transmitida para o bebê no momento da passagem da criança pelo canal de parto contaminado (candidíase neonatal). Outra infecção bastante grave, associada com a vaginal, é a candidíase congênita, a qual surge pela infestação ascendente do útero, e as lesões são disseminadas na pele e aparecem cerca de doze horas após o parto. Em prematuros ou recém-nascidos de baixo peso, a candidíase congênita pode ser fatal (NOVAK, 1983; SIMONETTI, 1996).

Os principais sintomas relacionados com estas infecções são prurido vulvar intenso, secreção vaginal, eritema e maceração (ANAISSIE *et al.*, 2004; HALL, 1999; TORRES *et al.*, 2000).

As infecções são tratadas topicamente com antifúngicos, dentre eles a nistatina e derivados imidazólicos (clotrimazol, cetoconazol, miconazol), entre outros. Em alguns casos, a terapia oral é recomendada, administrando-se cetoconazol (200 mg/dia, durante seis dias), fluconazol (150 mg, dose mensal) e itraconazol, eficaz nos casos de vulvovaginitis aguda (200 mg/dia, durante três dias) (CONTET-AUDONNEAU; SCHMUTZ, 2001).

O sertaconazol constitui um novo fármaco antimicótico sintético, com amplo espectro de ação, efetivo, especialmente para espécies de *Candida*, sendo mais eficaz que os principais compostos existentes. Adicionalmente, os resultados *in vitro* correlacionam-se com os encontrados *in vivo*, empregando-se modelos animais de infecções vaginais, e demonstram sua grande atividade no tratamento de vulvovaginites (PALACÍN *et al.*, 2000; TORRES *et al.*, 2000).

#### **3.1.2.4 Candidíase da mucosa oral**

Além da mucosa vaginal, a *Candida* spp. pode proliferar-se na mucosa oral, causando estomatite, vulgarmente conhecida como “sapinho”, ocorrendo, principalmente, em lactentes, sendo disseminada pelo contato (HALL, 1999; LACAZ *et al.*, 2002; LEVINSON; JAWETZ, 1998).

As lesões são caracterizadas por placas esbranquiçadas, delimitadas, circulantes ou ovais, podendo afetar as bochechas, o palato, a faringe, a laringe, bem como a língua (HALL, 1999; LACAZ *et al.*, 2002).

As infecções são causadas, principalmente, pela *C. albicans*; entretanto, outras espécies, como *C. glabrata*, *C. tropicalis*, *C. krusei* e *C. parapsilosis* são responsáveis, em menor frequência, por tais condições (HOEPELMAN; DUPONT, 1996).



### 3.1.3 Utilização de óleos voláteis no tratamento de micoses superficiais

Diversos medicamentos empregados no tratamento de micoses superficiais encontram-se disponíveis comercialmente; entretanto, é evidente a necessidade de novos agentes antifúngicos, com maior espectro de ação, uma vez que o número de fungos patogênicos e formas atípicas de dermatófitos, aliado à resistência microbiana apresentada por algumas espécies, tem aumentado significativamente. Adicionalmente, o aumento de pacientes imunodeprimidos, as más condições de higiene e alimentação e a variedade de fármacos empregados na quimioterapia e transplantes contribuem para a incidência de infecções (DiDOMENICO, 1999; STEFANAKI *et al.*, 2002).

A aromaterapia, terapia que utiliza óleos voláteis, constitui, por alguns especialistas, um tratamento alternativo para algumas patologias. Esta prática baseia-se nas propriedades medicinais apresentadas por determinadas substâncias presentes nos óleos, os quais são aplicados externamente, através de massagens, compressas ou por inalação (INOUYE, 2003; STEVENSEN, 1998).

Uma das maiores aplicações da aromaterapia é no tratamento de doenças infecciosas. As pesquisas científicas relacionadas ao efeito antimicrobiano apresentado pelos óleos voláteis iniciaram no século 19, no Instituto Pasteur. Em 1887, Chamberland estudou a atividade dos óleos de orégano, canela e cravo frente ao *Bacillus anthracis*; em 1952 e 1953, Okazaki e Oshima investigaram a atividade antimicrobiana de, aproximadamente, 1000 espécies de plantas e verificaram uma maior atividade para aquelas que apresentavam, em sua composição, óleos voláteis. Além disso, observou-se que os óleos apresentavam maior atividade contra fungos em relação a bactérias, especialmente, as Gram-negativas (INOUYE, 2003). Em 1958, Maruzzella e colaboradores determinaram a atividade antifúngica de 92 óleos voláteis (MARUZZELLA e LIGOURI *apud* INOUYE, 2003) e, desde então, algumas pesquisas têm sido publicadas.

Diversos óleos voláteis têm apresentado atividade antifúngica em estudos *in vitro*. Adicionalmente, ensaios pré-clínicos e clínicos são realizados, demonstrando seu potencial na terapia de algumas micoses superficiais (HARRIS, 2002).

A atividade antifúngica de alguns óleos, dentre eles, *C. citratus*, foi avaliada por KISHORE e colaboradores (1993) na pele de cobaias infectadas com *T. rubrum* e *M. gypseum*. Neste estudo, os animais foram tratados com pomadas contendo os óleos, por um período de seis dias ou até completa cura das lesões, duas vezes ao dia. Os resultados obtidos comprovaram a eficácia do óleo de *C. citratus* no tratamento das lesões produzidas, correlacionando-se com os estudos *in vitro*.

Outro trabalho, empregando-se cobaias infectadas com *C. albicans*, foi realizado por SURESH e colaboradores (1997), no qual verificou-se a atividade antimicótica do óleo de *Santonilla chamaecyparissus* em candidíase cutânea.

O óleo de *Melaleuca alternifolia* tem sido empregado como anti-séptico na Austrália e estudos comprovaram sua eficácia no tratamento tópico de onicomicoses (BUCK *et al.*, 1994). Estudos clínicos em pacientes com *Tinea pedis* demonstraram sua atividade farmacológica. A eficácia do óleo de *M. alternifolia* (creme a 10%) foi comparada com tolnaftato (creme a 1%). Pacientes tratados com o óleo apresentaram redução dos sintomas da infecção, semelhante ao tolnaftato (TONG *et al.*, 1992). Adicionalmente, a atividade antifúngica do óleo de *M. alternifolia* foi avaliada em modelo animal de candidíase vaginal, empregando-se cepas de *C. albicans* suscetíveis e resistentes ao fluconazol. Os resultados obtidos demonstraram a eficácia da terapia com o óleo (5%), obtendo-se a cura das infecções em três semanas de tratamento (MONDELLO *et al.*, 2003).

---

MARUZZELLA, J.C.; LIGOURI, L. The *in vitro* antifungal activity of essential oils. **J. Am. Pharm. Assoc** (Easton), v. 47, p. 250-254, 1958 apud INOUYE, S. Laboratory evaluation of gaseous essential oils (Part 1). **Int. J. Aromather** (Provence), v. 13, n. 2/3, p. 95-107, 2003.

De maneira a demonstrar a importância da utilização de óleos voláteis no tratamento de doenças cutâneas, alguns casos clínicos foram relatados por HARRIS (2002):

- Tratamento de *Tinea cruris* em um paciente com 44 anos de idade e 15 anos de histórico da doença, o qual apresentava, também, *Tinea pedis*. Foi administrada uma loção contendo os óleos de *C. citratus*, *Leptospermum petersonii*, *Origanum majorana*, *Satureja Montana*, e *Syzygium aromaticum*, além de hidrolatos de *Achillea millefolium*, *Helichrysum italicum* e *Mentha piperita*, estes com ação antiinflamatória. A terapia foi realizada durante quatro semanas, sendo que na terceira semana não se observou sinais de infecção. Adicionalmente, cuidados com a higiene do corpo e das roupas foram importantes para prevenir reinfecções.
- Tratamento de caspa, causada por *M. furfur*, em uma paciente com 51 anos de idade, empregando dois géis: um composto pelos óleos de *Cedrus atlantica*, *Melaleuca ericifolia*, *Pogoslemon cablin*, *Pelargonium graveolens*, *Rosmarinus officinalis* e *Santalum album*, e o outro por *Cedrus atlantica*, *Cinnamomum zeylanicum*, *Commiphora myrrha*, *Melaleuca ericifolia*, *Pogoslemon cablin*, *Pelargonium graveolens*, *Rosmarinus officinalis*, *Santalum album* e *Veliveria zizanioides*. A escolha da base gel baseou-se na necessidade de promover a circulação de ar no couro cabeludo e prevenir o contato com o calor e a transpiração, podendo aumentar o crescimento do fungo. Em três semanas de tratamento, observou-se uma redução considerável de crostas e eritema.
- Tratamento de candidíase cutânea (intertrigo) causada por *C. albicans*, empregando-se uma loção contendo os óleos de *Cymbopogon martinii*, *Melaleuca alternifolia* e *Lavandula x intermedia*, e hidrolatos de *Mentha piperita*, *Oryganum marjorana* e *Thymus vulgaris*. Na segunda semana de tratamento os sintomas relacionados à infecção desapareceram, continuando as aplicações por mais duas semanas, obtendo-se a cura da doença.

A utilização de óleos voláteis no tratamento de micoses superficiais, requer alguns cuidados especiais, de maneira a obter a completa cura da infecção, além de prevenir reincidências. As doenças fúngicas estão relacionadas ao habitat e às condições imunológicas do hospedeiro. Assim, a mudança de hábitos alimentares e de higiene é, em alguns casos, requerida, com o objetivo de melhorar a qualidade de vida do paciente (HARRIS, 2002).

O tratamento de algumas patologias, como onicomicoses, é longo, podendo levar até 12 meses para se obter a cura das lesões. Para tal, a adesão do paciente à terapia é fundamental. Sinais e sintomas podem desaparecer antes do término do tratamento; entretanto, a suspensão do medicamento não deve ser realizada até que se complete todo o período estipulado (HARRIS, 2002).

Para micoses superficiais, exceto onicomicoses, recomenda-se a incorporação de óleos voláteis em bases aquosas, proporcionando uma boa penetração na pele. Pomadas e pastas apresentam eficácia limitada, mas são importantes no tratamento de onicomicoses, pois formam uma camada oclusiva, que pode auxiliar na fixação do óleo na unha. Além disso, alguns compostos voláteis, em altas doses, podem causar reações de irritação e sensibilização da pele. Nestes casos, recomenda-se a diminuição da dose aplicada e o aumento da frequência das aplicações (HARRIS, 2002).

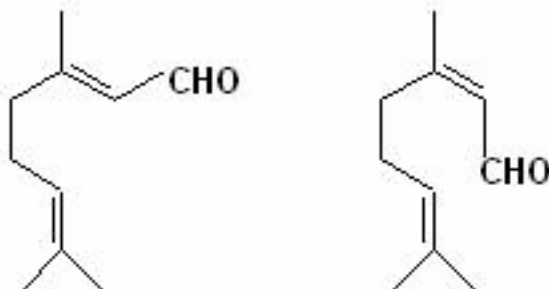
### 3.2 ÓLEO VOLÁTIL DE *Cymbopogon citratus*

O *Cymbopogon citratus* (DC) Stapf (*Gramineae*), popularmente conhecido no Brasil como capim-cidrô, capim-limão, capim-santo ou capim-cidreira (F. Bras. IV, 2003), é uma planta bastante cultivada em nosso país, especialmente no Rio Grande do Sul. É uma espécie originária da Ásia e ocorre espontaneamente em regiões tropicais (GUENTHER, 1950).

As folhas de *C. citratus* são ricas em seu óleo volátil, conhecido, internacionalmente, como *lemongrass*. É um dos mais importantes óleos voláteis, sendo empregado na obtenção de citral, como fragrância em cosméticos e aromatizante em alimentos (GUENTHER, 1950; FERREIRA; FONTELES, 1989), além de apresentar propriedades antimicrobianas, antioxidantes (BARATTA *et al.*, 1998; SACCHETTI *et al.*, 2005), antiparasitárias (KIM *et al.*, 2004) e inseticidas (OYEDELE, 2002; RAJAPAKSE; VAN EMDEN, 1997).

O óleo volátil é caracterizado pela presença de monoterpenos, sendo o citral, uma mistura de dois isômeros geométricos, geranial (citral a, forma *trans*) e neral (citral b, forma *cis*), seu principal componente. Devido ao alto teor de citral, o óleo possui forte odor de limão (GUENTHER, 1950; FERREIRA; FONTELES, 1989).

O citral (3,7-dimetil-2,6-octadienal) (Figura 3.1) é utilizado como material de partida na síntese de iononas e vitamina A, como fragrância em cosméticos e aromatizante em alimentos (GUENTHER, 1950; FERREIRA; FONTELES, 1989), e apresenta atividade antimicrobina (CHAUMONT; LÉGER, 1992; KURITA *et al.*, 1981; MAHMOUD, 1994; ONAWUNMI *et al.*, 1984; ONAWUNMI, 1989; PALHANO *et al.*, 2004; WANNISSORN *et al.*, 1996; WOLKEN *et al.*, 2002) e inseticida (VARTAK *et al.*, 1994).



**FIGURA 3.1** – Estrutura química do citral.

O óleo volátil de *C. citratus* tem despertado grande interesse nas pesquisas do Laboratório de Controle de Qualidade (Faculdade de Farmácia, UFRGS). Inicialmente, investigações na composição química da planta coletada na cidade de Porto Alegre foram realizadas. Neste estudo, verificou-se que o óleo apresentava um alto teor de citral (78,5), além de outros compostos, como acetato de geranila, geraniol e  $\beta$ -mirceno.

Em 1994, deu-se continuidade aos estudos da atividade antimicrobiana do óleo volátil e de preparações extrativas do *C. citratus*. Neste trabalho, verificou-se a acentuada atividade antifúngica do óleo volátil frente à *C. albicans*, obtendo-se a inibição total da levedura quando utilizou-se 20  $\mu$ l de óleo nos ensaios de difusão em ágar (SCHUCK *et al.*, 2001).

Os resultados encontrados nos trabalhos, bem como os dados obtidos na literatura em relação ao seu potencial microbiológico, levaram ao desenvolvimento de formulações de uso tópico contendo em sua composição o óleo volátil de *C. citratus*, visando sua aplicação como antifúngico (RAUBER, 2001).

A incorporação do óleo em bases semi-sólidas foi satisfatória, em especial em emulsões não-iônicas e gel hidrofílico. Estas formulações foram, então, selecionadas para dar continuidade a novas pesquisas, além de outras formulações descritas neste trabalho.

### 3.2.1 Atividade antimicrobiana

As pesquisas relacionadas à avaliação da atividade antimicrobiana do óleo volátil de *C. citratus*, bem como de seu principal componente, citral, iniciaram há, aproximadamente, 20 anos atrás.

Diversos trabalhos têm demonstrado a atividade antibacteriana e antifúngica do óleo volátil e de citral frente a espécies de bactérias e fungos, causadores de infecções humanas e animais, bem como espécies responsáveis por deterioração de alimentos. Alguns resultados encontram-se relatados na Tabela 3.3.

**TABELA 3.3** – Pesquisas envolvendo a atividade antimicrobiana do óleo volátil de *C. citratus*, em especial frente a espécies causadoras de infecções humanas e animais.

<b>Espécie</b>	<b>Resultados</b>	<b>Referência</b>
<i>Escherichia coli</i> <i>Bacillus subtilis</i> <i>Staphylococcus aureus</i>	Atividade antibacteriana apresentada pelo óleo e citral.	ONAWUNMI <i>et al.</i> , 1984
<i>E. coli</i>	Avaliação da atividade antibacteriana e mecanismo de ação.	OGUNLANA <i>et al.</i> , 1987
<i>Epidermophyton floccosum</i> <i>Microsporum canis</i> <i>Trichophyton mentagrophytes</i> <i>T. rubrum</i>	Atividade antifúngica frente a 81% das espécies testadas (total de 16 espécies).	LIMA <i>et al.</i> , 1992
<i>M. gypseum</i> <i>T. rubrum</i>	Atividade antifúngica <i>in vitro</i> (100% de inibição, a 1000 ppm – ação fungicida) e <i>in vivo</i> .	KISHORE <i>et al.</i> , 1993
<i>E. floccosum</i> <i>M. canis</i> <i>T. mentagrophytes</i> <i>T. rubrum</i>	Atividade antifúngica frente a todas as espécies avaliadas.	LIMA <i>et al.</i> , 1993
<i>E. coli</i>	O óleo apresentou efeito bactericida e concentração inibitória mínima (CIM) de 1,66 µg/ml.	PATTANAİK <i>et al.</i> , 1995a

Continua na página 42.

TABELA 3.3 – Pesquisas envolvendo a atividade antimicrobiana do óleo volátil de *C. citratus*, em especial frente a espécies causadoras de infecções humanas e animais.

<b>Espécie</b>	<b>Resultados</b>	<b>Referência</b>
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Resistência apresentada pelo óleo volátil; CIM superior a 20 µg/ml.	PATTANAIAK <i>et al.</i> , 1995b
<i>E. floccosum</i> <i>M. gypseum</i> <i>T. mentagrophytes</i> <i>T. rubrum</i>	O óleo apresentou ação fungicida, obtendo-se para <i>T. mentagrophytes</i> , <i>T. rubrum</i> , <i>E. floccosum</i> e <i>M. canis</i> a CIM de 122,5; 135; 115 e 235 µg/ml, respectivamente. Cremes com o óleo demonstraram uma ação dose-dependente.	WANNISSORN <i>et al.</i> , 1996
<i>Alcaligenes faecalis</i> <i>A. niger</i> <i>B. subtilis</i> <i>E. coli</i> <i>Lactobacillus plantarum</i> <i>P. aeruginosa</i> <i>S. aureus</i> <i>S. pullorum</i> <i>Streptococcus faecalis</i> <i>Yersinia enterocolitica</i>	Importante atividade antibacteriana e antioxidante apresentada pelo óleo, demonstrando sua potente aplicação na indústria farmacêutica e alimentícia.	BARATTA <i>et al.</i> , 1998
<i>Candida albicans</i>	O óleo volátil apresentou bons resultados, inibindo 90% das cepas testadas.	CARMO <i>et al.</i> , 1998
<i>S. aureus</i> <i>B. subtilis</i> <i>E. coli</i> <i>P. aeruginosa</i>	Avaliação da atividade antibacteriana na concentração de 20,9 mg/ml.	EL-KAMALI <i>et al.</i> , 1998
<i>Acinetobacter baumannii</i> <i>Aeromonas sabria</i> <i>C. albicans</i> <i>Enterococcus faecalis</i> <i>E. coli</i> <i>Klebsiella pneumoniae</i> <i>P. aeruginosa</i> <i>Salmonella typhimurium</i> <i>Serratia marcescens</i> <i>S. aureus</i>	O óleo volátil inibiu o crescimento de todos os microrganismos testados; CIM de 0,06%; 0,12% e 0,06% (v/v) para <i>S. aureus</i> , <i>E. coli</i> e <i>C. albicans</i> , respectivamente.	HAMMER <i>et al.</i> , 1999

Continua na página 43.



TABELA 3.3 – Pesquisas envolvendo a atividade antimicrobiana do óleo volátil de *C. citratus*, em especial frente a espécies causadoras de infecções humanas e animais.

Espécie	Resultados	Referência
<i>Didymella bryoniae</i>	Óleo volátil inibiu 100% do crescimento micelar e a germinação de esporos.	FIORI <i>et al.</i> , 2000
<i>Aspergillus fumigatus</i>	Efeito inibitório pelos vapores do óleo, dificultando o crescimento do fungo.	INOUYE <i>et al.</i> , 2000
<i>C. albicans</i> <i>E. coli</i> <i>S. aureus</i>	Avaliação da atividade de extratos e do óleo volátil; o óleo demonstrou ação frente a todas as espécies, em especial, <i>C. albicans</i> .	SCHUCK <i>et al.</i> , 2001
<i>C. albicans</i> <i>P. aeruginosa</i> <i>S. typhi</i> <i>S. typhimurium</i> <i>S. enteritidis</i> <i>Shigella flexneri</i> <i>S. aureus</i> <i>Vibrio cholerae</i>	Verificou-se a importante ação antibacteriana do óleo frente a bactérias causadoras de infecções intestinais e respiratórias; para <i>C. albicans</i> , evidenciou-se seu potente efeito e sua importância no tratamento de micoses causadas pela levedura.	ALZAMORA <i>et al.</i> , 2001
<i>T. mentagrophytes</i> <i>T. rubrum</i>	Avaliação da atividade antifúngica através de 2 métodos: exposição a vapores e diluição em ágar. A dose (vapor) e a concentração (diluição) inibitória mínima para o óleo de <i>C. citratus</i> foi de 1,0 e 50 µg/ml, respectivamente.	INOUYE <i>et al.</i> , 2001
<i>B. subtilis</i> <i>Citrobacter spp.</i> <i>C. diversus</i> <i>E. coli</i> <i>Klebsiella oxytoca</i> <i>K. pneumoniae</i> <i>P. aeruginosa</i> <i>P. vulgaris</i> <i>S. typhimurium</i> <i>S. flexneri</i> <i>S. aureus</i>	Atividade antibacteriana, realizada pelo método de difusão em ágar, empregando 5 µl de óleo e os halos de inibição obtidos foram de 8 mm ( <i>C. diversus</i> ) a 17 mm ( <i>E. coli</i> ).	CIMANGA <i>et al.</i> , 2002

Continua na página 44.

TABELA 3.3 – Pesquisas envolvendo a atividade antimicrobiana do óleo volátil de *C. citratus*, em especial frente a espécies causadoras de infecções humanas e animais.

Espécie	Resultados	Referência
<i>C. albicans</i>	Atividade antifúngica apresentada pelo óleo volátil e citral.	ABE <i>et al.</i> , 2003
<i>Helicobacter pylori</i>	O óleo de <i>C. citratus</i> apresentou maior atividade bactericida, inibindo totalmente o crescimento, na concentração de 0,01% (v/v); as cepas estudadas não apresentaram resistência. Nos ensaios <i>in vivo</i> , o nº de colônias nos animais infectados foi reduzido após administração oral do óleo.	OHNO <i>et al.</i> , 2003
<i>A. fumigatus</i> <i>T. mentagrophytes</i> <i>S. pyogenes</i> <i>S. aureus</i> <i>E. coli</i>	Determinação da dose inibitória mínima de 7 óleos voláteis, dentre eles, <i>C. citratus</i> e citral. Os óleos foram mais ativos contra os fungos filamentosos que bactérias ou leveduras.	INOUYE, 2003
<i>Listeria innocua</i> <i>L. monocytogenes</i> <i>S. aureus</i>	O óleo volátil apresentou moderada atividade antibacteriana; o efeito antibacteriano frente a <i>L. innocua</i> foi verificado pela técnica de citometria de fluxo.	NGUEFACK <i>et al.</i> , 2004b
<i>C. albicans</i> <i>Rhodotorula glutinis</i> <i>Saccharomyces cerevisiae</i> <i>Schizosaccharomyces pombe</i> <i>Yarrowia lypolitica</i>	Ampla espectro de ação observado para o óleo volátil.	SACCHETTI <i>et al.</i> , 2005
<i>S. typhimurium</i> <i>S. enteritidis</i> <i>E. coli</i> <i>Clostridium perferingens</i> <i>Campylobacter jejunii</i>	Atividade antibacteriana apresentada para todas as espécies testadas, em especial <i>C. perferingens</i> e <i>C. jejunii</i> (halos de inibição de 90 mm).	WANNISSORN <i>et al.</i> , 2005

A relação entre a atividade antimicrobiana e a composição química do óleo volátil é fundamental para o melhor entendimento de suas propriedades, a fim de verificar quais os componentes responsáveis por seu efeito antimicrobiano e possíveis interações que possam existir entre eles.

ONAWUNMI e colaboradores (1984) realizaram uma importante investigação da atividade antimicrobiana do óleo volátil e de alguns de seus componentes (citral, citronelal, citronelol, geraniol, heptanona, linalol, limoneno e  $\beta$ -mirceno) frente a cepas de *E. coli*, *B. subtilis* e *S. aureus*. Verificou-se que a atividade antibacteriana reside, principalmente, no citral;  $\beta$ -mirceno, heptanona e limoneno não apresentaram atividade e os demais compostos demonstraram um pequeno efeito bacteriano. Combinações de citral e os demais constituintes foram, também, avaliadas. Os resultados obtidos sugerem que o  $\beta$ -mirceno, apesar de não apresentar atividade, possa contribuir com a ação exercida pelo citral, causando efeito sinérgico.

Outros trabalhos vêm corroborar a importância de citral no efeito inibitório do óleo volátil sobre os microrganismos. Resultados semelhantes foram obtidos para o óleo (contendo citral na concentração de 75 a 78%) e para o citral na avaliação de suas propriedades antibacteriana e antifúngica (ONAWUNMI, 1989; WANNISSORN *et al.*, 1996). Nas pesquisas realizadas por WANNISSORN e colaboradores (1996) resultados iguais foram encontrados na avaliação da atividade antifúngica do óleo volátil e do citral frente às espécies *T. mentagrophytes*, *T. rubrum*, *E. floccosum* e *M. canis*, obtendo-se halos de inibição de 90 mm para ambas amostras, empregando-se 20  $\mu$ l de cada nos ensaios de difusão em ágar;  $\beta$ -mirceno, não apresentou efeito inibitório. As atividades antimicrobianas do citral e do óleo volátil são semelhantes e, sob o ponto de vista econômico, o óleo poderá ser usado em substituição ao citral como agente antimicrobiano (ONAWUNMI, 1989).

Além de apresentar efeito inibitório contra patógenos humanos, o óleo volátil tem uma importante atividade na inibição de fungos causadores de deterioração de alimentos. Espécies de *Aspergillus flavus* e *A. fumigatus*, *Fusarium moniliforme*, *F.*

*oxysporum*, *Microphomina phaseoli*, *Penicillium chrysogenum*, entre outras, são responsáveis por causar doenças em algumas leguminosas, como ervilha e milho. O crescimento microbiano de tais fungos foi inibido pela ação antifúngica do óleo volátil (ADEGOKE; ODESOLA, 1996; MISHRA; DUBEY, 1994; NGUEFACK *et al.*, 2004a), o qual apresentou amplo espectro de ação, superior aos fungicidas sintéticos (MISHRA e DUBEY, 1994). Amostras de milho e ervilha, tratadas com pó obtido das folhas de *C. citratus*, e incubadas durante dez dias, não demonstraram sinais de deterioração. Nas amostras controle observou-se modificações da cor e do odor, além da presença de insetos (ADEGOKE; ODESOLA, 1996).

O crescimento de fungos em alimentos pode causar alterações organolépticas (cor, odor), mudanças nas suas características químicas e nutricionais, além da contaminação por micotoxinas, como aflatoxinas, que são altamente tóxicas ao homem e animais (PARANAGAMA *et al.*, 2003). *Aspergillus flavus* é um importante fungo causador de deterioração de cereais e legumes, responsável pela produção de aflatoxinas; *Fusarium verticillioides* e *F. proliferatum* infectam o milho, produzindo fumonisinas. O óleo volátil tem apresentado atividade inibitória no crescimento micelar destes fungos e na produção de micotoxinas (PARANAGAMA *et al.*, 2003; VELLUTI *et al.*, 2003; VELLUTTI *et al.*, 2004).

Além do óleo volátil, o citral, também, apresenta efeito inibitório no crescimento de fungos causadores de infecções em plantas e na produção de toxinas, o que demonstra a sua importância na atividade antifúngica apresentada pelo óleo volátil de *C. citratus* (MAHMOUND, 1994; WOLKEN *et al.*, 2002). O efeito inibitório do óleo volátil e do citral, em combinação com a técnica de alta pressão hidrostática (medida não térmica para a destruição de microrganismos), a esporos de *Colletotrichum gloeosporioides*, foi avaliado por PALHANO e colaboradores (2004). Este fungo é responsável por causar antracnose no fruto de mamão, e a combinação das técnicas utilizadas foi capaz de reduzir, significativamente, a viabilidade dos esporos de *C. gloeosporioides*.

Assim, a utilização do óleo volátil de *C. citratus* na conservação de alimentos constitui um método alternativo e econômico, possibilitando a ausência ou a redução do crescimento de microrganismos, especialmente, em cereais. Além disso, uma melhor qualidade do produto e a redução dos efeitos indesejáveis causados pelos fungicidas sintéticos poderá ser alcançada (ADEGOKE; ODESOLA, 1996; MISHRA; DUBEY, 1994; PARANAGAMA *et al.*, 2003).

Conforme relatado, diversos trabalhos têm demonstrado a atividade antibacteriana e antifúngica do óleo volátil de *C. citratus*, comprovando seu amplo espectro de ação e sua importância no tratamento e controle de infecções. Na busca de novas substâncias com propriedades antivirais, MINAMI e colaboradores (2003) avaliaram a atividade antiviral *in vitro* e o modo de ação de alguns óleos voláteis contra Herpes simples tipo I (HSV-1). O óleo volátil de *C. citratus* apresentou significativo efeito, inibindo completamente o crescimento do vírus, a uma concentração de 0,1%, destacando-se entre os demais óleos testados (*Cupressus sempervirens*, *Juniperus communis*, *Melaleuca alternifolia*, *Ocimum basilicum* *album*, *Mentha piperita*, *Origanum majorana*, *Eucalyptus globulus*, *Ravensara aromática*, *Lavandula latifolia*, *Citrus limonum* e *Rosmarinus officinalis*). Além disso, o modo de ação apresentado pelos óleos se relaciona à inativação direta da partícula viral, ligando-se ao envelope e às glicoproteínas. Assim, o uso tópico de óleos voláteis, especialmente, o óleo de *C. citratus*, pode ser promissor no tratamento de infecções causadas por HSV-1.

### **3.2.2 Mecanismo de ação**

O mecanismo de ação dos óleos voláteis não está, totalmente, esclarecido. Sugere-se que sua ação ocorra, predominantemente, na membrana celular dos fungos, através de alguns processos: destruição da membrana, alterando sua fluidez e permeabilidade, e com isso, provocando a morte celular; inibição da proliferação celular fúngica; bloqueio da síntese da membrana e, inibição da respiração celular (HARRIS, 2002).

Neste sentido, algumas pesquisas foram conduzidas, buscando verificar o efeito de alguns compostos, incluindo o óleo volátil de *C. citratus* e citral, nas células de microrganismos.

A ação antifúngica de óleos voláteis está relacionada com a estrutura química dos compostos presentes nos mesmos. KURITA e colaboradores (1981) avaliaram a atividade antifúngica de quarenta substâncias (aldeídos alifáticos e aromáticos, álcoois, hidrocarbonetos), empregando sete espécies de fungos, com o objetivo de verificar diferenças entre os compostos, no que se refere ao efeito biológico e a natureza química dos mesmos. Desta forma, algumas constatações foram possíveis: aldeídos alifáticos, que apresentam uma ou mais ligações duplas conjugadas à carbonila, demonstram maior atividade antifúngica; álcoois primários são mais potentes que os secundários e terciários e, comparando-se a atividade antifúngica do componente álcool com o seu respectivo aldeído (citronelol e citronelal, por exemplo), verifica-se que a presença do radical hidroxil confere um maior efeito; a adição de radicais alquil ao anel benzênico, como fenol e guaiacol, leva a um aumento da atividade antifúngica, e tal efeito parece estar relacionado ao tamanho do radical alquil presente (radicais maiores proporcionam uma maior atividade), em função do caráter hidrofóbico dos mesmos; os compostos hidrocarbonetos avaliados (limoneno,  $\alpha$  e  $\beta$ -pineno, canfeno,  $\beta$ -mirceno,  $\beta$ -cariofioleno e  $\rho$ -cimeno) não apresentaram atividade antifúngica. Ainda, os autores avaliaram a relação entre a atividade antifúngica dos compostos carbonílicos e a energia do orbital molecular, de maneira a elucidar seu mecanismo de ação. A atividade antifúngica de aldeídos alifáticos (cinamaldeído, citral, perilaldeído) é, em grande parte, devida a sua habilidade em formar complexo de transferência de carga com doadores de elétrons das células fúngicas.

A atividade antimicrobiana e o mecanismo de ação do óleo volátil de *C. citratus* nas células de *Escherichia coli* foi investigado por OGUNLANA e colaboradores (1987), através de microscopia eletrônica e pela investigação de alterações na parede celular. O óleo provocou alterações morfológicas na superfície das células bacterianas, causando alongamento das mesmas, inibição da formação do septo, formação de

esferoplastos, produção de vesículas ou mesossomas, como, também, lise celular e desenvolvimento de células anormais, além de interferir na síntese de peptídeoglicanos. Este tipo de resposta assemelha-se à ligação dos antibióticos  $\beta$ -lactâmicos às proteínas, como foi verificado na ligação de penicilina-proteína 3 de células bacterianas (SATL e colaboradores, 1983 *apud* OGUNLANA *et al.*, 1987).

Adicionalmente, o efeito antibacteriano dos óleos voláteis de *Eucalyptus citriodora*, *C. citratus*, *C. martinii* e *Mentha piperita* na viabilidade e morfologia de células de *E. coli* foi avaliado por PATTANAIK e colaboradores (1995a). Os óleos testados apresentaram efeito bactericida, induzindo a destruição instantânea e irreversível das células bacterianas.

A ação de substâncias voláteis na membrana celular dos fungos relaciona-se a possíveis alterações nas funções bioquímicas e nos processos enzimáticos da mesma. Avaliando de forma mais específica, ensaios realizados com cepas de *Candida* (BARD *et al.*, 1988) e *Saccharomyces* (BARD *et al.*, 1988; URIBE *et al.*, 1985) demonstraram o modo de ação de compostos voláteis na membrana dos fungos. A atividade antifúngica de substâncias lipofílicas reside em sua habilidade de destruição das estruturas da bicamada lipídica, causando um aumento na fluidez e permeabilidade da membrana, além de inibir a respiração celular, indicando um efeito na mitocôndria das células.

---

SALT, W.G.;STRETTON, R.J.;WALL, M.E. Ampicillin induced septum formation in *Bacillus cereus*. **Microbios** (Cambridge), v. 36, p. 113-125, 1983 *apud* OGUNLANA, E.O.; HÜGLUND, S.; ONAWUNMI, G.; SKÖLD, O. Effects of lemongrass oil on morphological characteristics and peptidoglycan synthesis of *Escherichia coli* cells. **Microbios** (Cambridge), v. 50, p. 43-59, 1987.

O efeito inibitório de sete óleos voláteis (*Cinnamon zeylanicum* - *cinnamon bark*, *Citrus junos* - *citron*, *Lavandula sp.* - *lavander*, *C. citratus* - *lemongrass*, *Perilla acuta* - *perilla*, *Melaleuca alternifolia* - *tea tree* e *Thymus vulgaris* - *thyme*) na respiração celular de quatro espécies de fungos filamentosos (*Aspergillus fumigatus*, *Fusarium solani*, *Penicillium expansum* e *Rhizopus oryzae*) foi avaliado por INOUE e colaboradores (1998). Morfologicamente, a formação de esporos ou conídios dos fungos foi suprimida pelos óleos voláteis, demonstrando uma atividade antiesporulante. Os óleos voláteis de limão (*citron*) e alfazema (*lavender*) demonstraram uma acentuada atividade inibitória na respiração celular; entretanto, os óleos de canela (*cinnamon*) e capim-cidró (*lemongrass*) apresentaram uma potente inibição no crescimento dos fungos e um leve efeito na esporulação ou respiração celular, sugerindo, desta forma, que diferentes mecanismos encontram-se envolvidos no processo de alongação e diferenciação da hifa. Os vapores dos óleos voláteis podem inibir a esporulação através de duas maneiras: pela ação direta na hifa aérea, e pelo efeito indireto no meio de cultura após a absorção do vapor.

Dando continuidade a esses estudos, INOUE e colaboradores (2000) avaliaram o efeito inibitório dos óleos voláteis no crescimento apical da hifa de *Aspergillus fumigatus*. Verificou-se que os óleos inibiram o crescimento apical do fungo, pelo acúmulo direto de seus vapores no micélio. Diferenças em relação ao modo de ação dos óleos utilizados foram observadas: os óleos de limão (*citron*), alfazema (*lavender*) e melaleuca (*tea tree*) apresentaram uma atividade rápida e reversível, podendo estar associada com a inserção seletiva de seus componentes na porção lipídica da membrana celular do conídio; ao contrário, os óleos contendo aldeídos como principais constituintes (*perilla* – *perilla*, e capim-cidró - *lemongrass*) foram mais potentes, demonstrando uma atividade irreversível, destruindo a membrana celular através de reações de ligação cruzada. Os óleos de tomilho (*thyme*) e canela (*cinnamon*) demonstraram uma atividade intermediária: o óleo de timo, contendo carvacrol como principal composto, foi capaz de desnaturar as proteínas da membrana celular; a ação moderada observada para o óleo de canela, que contém cinamaldeído como componente principal, pode ser devido, em parte, a sua baixa volatilidade e,



conseqüentemente, baixo acúmulo na membrana fúngica. De um modo geral, de acordo com o ciclo de vida de espécies de *Aspergillus*, os locais de ação dos óleos voláteis compreendem: o processo de germinação do conídio (formação do tubo germinativo), o crescimento apical da hifa (alongação – micélio aéreo) e a esporulação (formação da fiálide e produção de grandes quantidades de conídios). Resultados semelhantes foram observados, também, para a espécie de *T. mentagrophytes* (INOUYE, 2003).

A atividade antifúngica da fase gasosa tem sido usualmente determinada pela zona de inibição do crescimento no meio inoculado com o microrganismo, após exposição a vapores de óleos voláteis; entretanto, a partir desta técnica, é difícil de elucidar o modo de ação do óleo volátil, uma vez que o efeito inibitório pode ser decorrente da ação direta dos vapores no fungo, ou se relaciona, indiretamente, à absorção do óleo no meio durante a incubação. Na avaliação da atividade antifúngica frente ao *A.fumigatus* verificou-se que os compostos voláteis lipofílicos são absorvidos pelo micélio do fungo através dos vapores dos óleos, e não, exclusivamente, por um processo de difusão, uma vez que a água presente no meio de cultura impede a solubilização destes compostos (INOUYE *et al.*, 2000).

Em estudos de biotransformação, WOLKEN e colaboradores (2002) avaliaram a toxicidade de terpenos (acetaldeído, ácido gerânico, citral, geraniol metilheptanona e nerol) para esporos e micélios de *Penicillium digitatum*. O efeito tóxico causado pelos compostos afetou não somente a membrana celular, mas, também, proteínas e enzimas presentes nas células, uma vez que a viabilidade de *P. digitatum* e a atividade de bioconversão foram suscetíveis aos efeitos provocados por tais substâncias. O citral apresentou maior toxicidade em comparação com os demais terpenos.

O efeito de óleos voláteis, popularmente utilizados no tratamento de infecções cutâneas, no crescimento de *C. albicans* foi investigado por ABE e colaboradores (2003). O crescimento micelar da levedura, que corresponde a sua capacidade de invadir os tecidos, foi inibido no meio de cultura contendo os óleos. O

óleo de *C. citratus* e citral inibiram o crescimento micelar e a forma leveduriforme de *C. albicans*.

PINA-VAZ e colaboradores (2004) avaliaram a atividade antifúngica de óleos voláteis do gênero *Thymus* (*T. mastichina*, *T. vulgaris* e *T. zygis*) contra *Candida* spp., empregando a análise citométrica de fluxo para prever o possível mecanismo de ação. Através desta técnica é possível verificar a lesão da membrana plasmática pelo efeito citotóxico da substância, empregando-se iodeto de propídeo como corante. Havendo destruição da membrana, as células mortas são coradas. Os óleos de *T. zygis* e *T. vulgaris*, especialmente, os quais apresentam como componentes principais carvacrol, timol e  $\rho$ -cimeno, demonstraram atividade antifúngica, resultando diretamente na destruição da membrana celular das leveduras. Sugere-se que os compostos presentes em tais óleos voláteis (monoterpenos) agem como solventes da membrana.

A atividade antifúngica do timol e eugenol foi avaliada por BENNIS e colaboradores (2004), utilizando *Sacharomyces cerevisiae* como microrganismo modelo. Os resultados obtidos demonstraram a ocorrência de morte celular, acompanhada de destruição das células. Adicionalmente, a análise microscópica revelou que o eugenol induziu deformações na estrutura celular de muitas células germinativas; o timol causou deformações em algumas células germinativas, além de romper a superfície de muitas células simples. Assim, sugere-se que o efeito destes compostos depende da fase de proliferação celular, e a destruição da membrana é acompanhada por uma alteração na sua superfície.

Atualmente, estudos de modelagem estrutural de atividade antifúngica, baseados na relação estrutura-atividade de compostos presentes em óleos voláteis são empregados, com o objetivo de verificar o efeito biológico da substância. A atividade antifúngica de 22 compostos voláteis (fenóis, éteres fenólicos e aldeídos aromáticos) foi avaliada por VODA e colaboradores (2004) frente aos fungos *Trametes versicolor* e *Coniophora puteana*, ambos responsáveis por causar a degradação da lignina e da celulose na madeira. Após identificar os elementos estruturais comuns nos compostos mais e menos ativos, quatro hipóteses foram formuladas: 1) compostos com dois ou

três grupos contendo oxigênio apresentaram uma pequena atividade contra os fungos testados quando comparados com compostos que continham somente um grupo oxigenado no anel aromático; 2) substituintes na posição 2 do anel aromático diminuem a atividade antifúngica (*o*-cresol e guaiacol); 3) grupos contendo oxigênio na posição 4 do anel aromático (hidroquinona e coniferaldeído) diminuem, também, a atividade de um composto, em comparação com compostos que apresentam grupos alquila saturados ou insaturados na mesma posição (*trans*-anetol, cuminaldeído); 4) compostos com grupos contendo oxigênio nas posições 2 e 4 do anel aromático (vanilina, etil vanilina e coniferaldeído) são menos ativos que compostos que apresentam grupos oxigenados na posição 2 e hidrocarbonetos na posição 4 (creosol, eugenol, isoeugenol). Além disso, o tamanho da cadeia do hidrocarboneto influencia na atividade antifúngica e uma maior atividade é esperada para compostos de maior cadeia. Através da técnica de QSAR (relação estrutura-atividade quantitativa) e análise de regressão por PLS (mínimos quadrados parciais) foi possível obter uma correlação entre a estrutura molecular dos compostos e sua atividade antifúngica. Os resultados obtidos coincidiram com a primeira e, parcialmente, com a terceira e quarta hipóteses, sugerindo que os dados estruturais são importantes para os estudos iniciais de relação estrutura-atividade.

### 3.2.3 Quantificação

A separação, identificação e quantificação de compostos em óleos voláteis (terpenos) são realizadas, em sua grande maioria, através da cromatografia gasosa (CG), apresentando uma alta sensibilidade na detecção de pequenas quantidades de substâncias (LOCKWOOD, 2001; McNAIR; MILLER, 1997) ou, em conjunto com outras técnicas de análise, como a técnica de *headspace*, para a detecção de pequenas quantidades de componentes voláteis em plantas ou em matrizes complexas, como preparações medicinais (LOCKWOOD, 2001).

A cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) é uma metodologia amplamente empregada para a quantificação de substâncias, em especial, na área farmacêutica, para matérias-primas, medicamentos, materiais biológicos, entre outros, sendo preconizada, também, pelos códigos oficiais (F. Bras. IV, 1988; USP 28, 2005). É uma técnica versátil, seletiva e sensível, utilizada desde a fase de desenvolvimento de fármacos e medicamentos, até o controle de qualidade.

A cromatografia líquida também pode ser empregada para a determinação de monoterpenos em preparações farmacêuticas ou materiais biológicos, isoladamente, ou com técnicas complementares, como cromatografia gasosa, espectrometria de massas, entre outras. Como exemplos, pode-se citar: determinação de mentol em estudos de cinética enzimática, empregando-se coluna de fase reversa e fase móvel metanol e água (80:20, v/v), com detecção a 240 nm; doseamento de cânfora em plasma e urina de eqüinos, após administração tópica de formulações (CHAN, 2001); avaliação da estabilidade de álcool perílico e formulação contendo tal substância, utilizando sistema de fase reversa, detector de arranjo de fotodiodo e detecção a 210 nm (GUPTA; MYRDAL, 2004).

TAO e PEREIRA (1998) desenvolveram um método analítico por CLAE para a análise e quantificação de carvona, cineol, álcool perílico, perilaldeído e sobrerol na dieta alimentar de animais de laboratório. Os compostos foram separados da mistura empregando-se sistema de fase reversa e fase móvel metanol:água (72:28, v/v). O método proposto foi validado e apresentou linearidade, precisão e exatidão apropriadas, podendo ser aplicado no controle de qualidade de tais preparações.

Com o objetivo de avaliar a composição química do óleo de *Salvia sclarea*, HUDAIB e colaboradores (2001) empregaram a CLAE e CG. Amostras de óleo volátil da planta coletada, bem como plantas infectadas com fabavírus e amostra comercial, foram analisadas, utilizando coluna de fase normal (cianopropil) e fase móvel *n*-hexano (fluxo de 1,0 ml/min), com detector de arranjo de fotodiodo. Os componentes do óleo foram separados em diferentes grupos de classes químicas (hidrocarbonetos, éteres, ésteres e álcoois) e a composição das frações verificada por CLAE foi confirmada pela

cromatografia gasosa, possibilitando a identificação de alguns compostos presentes no óleo, como acetato de linalila, linalol e  $\alpha$ -terpineol. Diferenças na composição química das amostras analisadas foram observadas empregando-se a combinação das técnicas analíticas, bem como uma melhor caracterização do óleo volátil.

De acordo com a literatura, o conteúdo de citral presente no óleo volátil de *C. citratus* é determinado por CG (F. Bras. IV, 2003) e diversos trabalhos têm empregado esta técnica analítica para a identificação e quantificação dos constituintes presentes no óleo volátil, especialmente, citral. Adicionalmente, WILSON e colaboradores (2002) desenvolveram um método de espectroscopia na região do infravermelho próximo para a quantificação de citral nos óleos de capim-cidró e de limão.

### 3.3 IRRITAÇÃO DÉRMICA

A aplicação de preparações farmacêuticas ou cosméticas na pele, além de cumprir uma função específica, pode causar um certo grau de toxicidade, como irritação, alergia ou, havendo a penetração cutânea de uma determinada substância, efeito sistêmico.

Preocupados com a segurança e a eficácia de diversas preparações, em especial, produtos cosméticos, órgãos fiscalizadores de países como Brasil, Estados Unidos e União Européia, regulamentam e fiscalizam, através de diretrizes específicas, ensaios de toxicidade e critérios a serem seguidos pelos fabricantes (BRASIL, 2003a; FDA, 2004; OECD, 2002).

Neste sentido, modelos experimentais *in vivo* e *in vitro*, os quais objetivam verificar qualitativa e quantitativamente o efeito dos produtos sobre a pele ou região dos olhos, são descritos.

O método padrão para avaliar o potencial de irritação cutânea, primária ou cumulativa, de um produto ou substância na pele, foi descrito por DRAIZE e colaboradores, em 1944 e, com algumas modificações, é empregado até os dias de hoje (PINTO *et al.*, 2003; ROBINSON *et al.*, 1999). Este ensaio baseia-se na quantificação das reações (edema e eritema) produzidas na pele de coelhos albinos (raça Nova Zelândia) após a aplicação do produto e, no caso de irritação ocular, nas reações observadas na córnea, íris e conjuntiva. Esta metodologia aplica-se a cosméticos, medicamentos, produtos químicos, de higiene, perfumes e correlatos (DRAIZE *et al.*, 1944; PINTO *et al.*, 2003; ROBINSON *et al.*, 1999).

De modo geral, no teste de irritação dérmica empregam-se de 3 a 6 animais, dependendo do protocolo oficial, e o produto é aplicado na pele dorsal tricotomizada dos coelhos, previamente submetidos a observação e seleção daqueles isentos de escoriações ou qualquer tipo de irritação cutânea. O produto é mantido

durante um tempo de exposição de quatro horas e as leituras das reações produzidas são efetuadas 24 e 72 horas após o início do teste (INCQS, 2002; OECD, 2002).

Os testes *in vivo* para a avaliação da segurança de produtos são bastante questionados por alguns pesquisadores, com ênfase para o ensaio de irritação ocular. Algumas técnicas alternativas estão sendo desenvolvidas, principalmente, em virtude da pressão exercida pelos órgãos de proteção aos animais, com o objetivo de empregar metodologias *in vitro* para a avaliação da irritação ou corrosão da pele (EUN; SUH, 2000; ROBINSON *et al.*, 1999). Estas técnicas incorporam vantagens adicionais, tais como sensibilidade e facilidade de execução. Por outro lado, não se constituem em um modelo que reproduza a resposta do ser humano ao agente agressor, necessitando de testes complementares (EUN; SUH, 2000).

As técnicas de culturas celulares têm sido amplamente empregadas para a avaliação da toxicidade dérmica de um produto ou substância. São metodologias econômicas, reprodutíveis e utilizadas para a redução ou substituição dos ensaios *in vivo* (EUN; SUH, 2000; FRESHNEY, 1994). As linhagens celulares são obtidas de diversos órgãos ou tecidos, de origem humana ou animal, cultivadas e mantidas em meios específicos, de maneira a manter suas características e integridade (FRESHNEY, 1994).

As metodologias desenvolvidas baseiam-se em testes de citotoxicidade, verificando-se o efeito tóxico de substâncias nas células, através de parâmetros como viabilidade celular, processos inflamatórios e alterações metabólicas (EUN; SUH, 2000; FRESHNEY, 1994). A viabilidade celular pelo uso de corantes vitais (MTT e vermelho neutro) é um dos ensaios mais empregados (FRESHNEY, 1994).

Diversas técnicas vêm sendo propostas para a avaliação da irritação ou corrosão da pele (FENTEM *et al.*, 2001; ROBINSON *et al.*, 2002):

- Teste de resistência elétrica transcutânea (TER): utiliza discos de epiderme de rato para avaliar a integridade do extrato córneo (teste de corrosão).

- Modelos de pele-equivalente: são culturas de células de queratinócitos humanos, empregadas na avaliação da viabilidade celular pela redução do MTT (brometo de 3 (4,5-dimetiltiazol-2-il) 2,5-difeniltetrazólio). São exemplos, EPISKIN<sup>®</sup> (modelo de pele humana tridimensional, consistindo de epiderme reconstituída com extrato córneo funcional) e EpiDerm<sup>®</sup> (modelo de pele humana reconstituída, derivado de queratinócitos humanos, formando uma multicamada), empregados como testes de irritação e corrosão; CORROSITEX<sup>®</sup> (matriz de colágeno reconstituído) e PREDISKIN<sup>®</sup> (culturas de pele humana), empregados como testes de corrosão.
- Teste da orelha de porco: baseia-se na perda de água trans-epidérmica (TEWL) da superfície da pele, diferenciando substâncias irritantes de não irritantes.
- Teste da função da integridade da pele de camundongo (SIFT): baseia-se na avaliação da integridade da pele de camundongo, empregando como parâmetro de avaliação a perda de água trans-epidérmica e a resistência elétrica.

As metodologias *in vitro* fornecem informações importantes a respeito da toxicidade de substâncias ou produtos, podendo ser empregadas como estudos de delineamento, a fim de verificar e selecionar produtos tóxicos. Desta maneira, os métodos alternativos proporcionam a redução de muitos experimentos *in vivo*, de acordo com o conceito dos 3Rs (*reduction, refinement e replacement*).

Contudo, para que um método *in vitro* possa substituir o ensaio em animais, o mesmo deve ser validado, sendo capaz de prever o resultado *in vivo*, garantindo o mesmo nível de proteção e confiabilidade dos métodos regulamentados.

Até o momento, não existem métodos validados para substituir os ensaios de irritação dérmica (ROBINSON *et al.*, 2002); entretanto, para a avaliação da corrosão, os testes de TER e o EPISKIN<sup>®</sup> foram validados e são capazes de diferenciar substâncias corrosivas de não corrosivas (LIEBSCH; SPIELMANN, 2002; ROBINSON *et al.*, 2002).



As reações de irritação provocadas pela aplicação de um produto ou substância na pele envolvem processos inflamatórios, e os efeitos biológicos produzidos dependem de muitos fatores, como a concentração ou dose da substância, a duração e frequência de exposição, ao local da pele exposto, e ao potencial tóxico intrínseco do composto. A complexidade dos mecanismos que envolvem estas respostas dificulta a correlação entre o modelo animal *in vivo* com os testes *in vitro*, e as reações produzidas por tais metodologias podem ser influenciadas por diversos fatores, como permeabilidade da membrana, natureza química da substância, características individuais das espécies (idade, sexo, raça) e métodos de avaliação das respostas à substância irritante (EUN; SUH, 2000; WELSS *et al.*, 2004).

De um modo geral, a irritação provocada por determinada substância na pele é decorrente da destruição do extrato córneo (função de barreira) e pelo efeito direto nas células da pele. O composto, ao penetrar no extrato córneo, pode causar a delipidação (desequilíbrio do balanço lipídico) e desnaturação proteica, resultando em alteração das camadas lipídicas e perda da função de barreira. Estes processos podem levar à perda de água trans-epidérmica, aumentando a penetração da substância irritante nas camadas epidérmicas, principalmente, onde se encontram os queratinócitos. Estas células desempenham um papel importante nos processos de inicialização, modulação e regulação da inflamação na epiderme (WELSS *et al.*, 2004).

Os testes *in vitro*, de um modo geral, empregam culturas celulares contendo células específicas (queratinócitos da epiderme e fibroblastos da derme, por exemplo), não apresentando outras células que também são importantes no mecanismo de inflamação da pele (células endoteliais sanguíneas, células inflamatórias) (EUN; SUH, 2000). No ensaio *in vivo* de irritação cutânea primária da pele, o ponto final é verificado pela formação de edema e eritema, decorrentes da inflamação vascular da pele (aumento do fluxo sanguíneo e da permeabilidade vascular, infiltração leucocitária e degeneração epidérmica). As culturas celulares não contêm todas as estruturas e substâncias envolvidas neste processo, além da diferenciação celular e a estrutura da pele (EUN; SUH, 2000; WARD *et al.*, 1998).

A maior sensibilidade apresentada nos testes *in vitro* foi verificada por HAYES e MARKOVIC (2002), na avaliação da toxicidade do óleo volátil de *Backhousia citriodora*, o qual contém, predominantemente, citral em sua composição. Os ensaios de citotoxicidade foram realizados empregando-se culturas celulares de fibroblastos e células epiteliais de pele humana. Comparando-se os resultados obtidos nos testes *in vitro* com os estudos em animais, verificou-se uma maior sensibilidade apresentada pelas culturas celulares, devido, provavelmente, ao acúmulo de metabólitos no interior das células, resultando em uma diferenciação nos processos de biotransformação e excreção, bem como às diferenças fisiológicas entre a pele dos animais de laboratório e a pele humana.

CRUZ (2003) realizou um estudo com 204 amostras de produtos cosméticos (batons, pós-compactos, bases faciais, sombras, máscaras para cílios, sabonetes líquidos, lápis e delineadores), empregando metodologias *in vivo* (irritação dérmica, ocular e da mucosa oral) e *in vitro* (citotoxicidade e reatividade biológica em culturas celulares), para avaliar a segurança biológica dos produtos. Comparando-se os resultados obtidos nos testes *in vivo* e *in vitro* verificou-se que a percentagem de amostras positivas no teste de irritação cutânea e ocular foi menor em relação ao teste com linhagens celulares. Adotando-se o critério da Farmacopéia Americana, que considera como amostras positivas àquelas que apresentam Índice de Zona (IZ) maior que 2, e considerando que toda a amostra não reativa no teste *in vitro* elimina a necessidade de avaliação *in vivo*, observou-se uma redução bastante significativa no número de animais utilizados. Do total de 1861 animais empregados, 1527 poderiam ser poupados.

A partir dessas observações, verifica-se a importância de empregar métodos alternativos como testes complementares e pré-seletivos na avaliação da irritação dérmica de preparações farmacêuticas, principalmente, em produtos cosméticos. Além disso, estas técnicas são econômicas e fornecem resultados em um menor intervalo de tempo quando comparadas com os testes com animais.

Numa outra abordagem, deve-se considerar que métodos para a identificação do potencial alergênico e irritante de fragrâncias, incluindo citral, são, também, desenvolvidos. Citral é empregado em diversos produtos cosméticos, de higiene, desinfetantes e perfumes, e reações alérgicas, como eczema nas mãos, estão associadas à exposição de produtos contendo citral, durante um longo período (CARDULLO *et al.*, 1989; HEYDORN *et al.*, 2003a; HEYDORN *et al.*, 2003b). Além disso, citral é relatado por apresentar propriedades irritantes e alergênicas (ALLENBY *et al.*, 1993; BASKETTER; SCHOLE, 1992; BASKETTER *et al.*, 1994; FROSCHE *et al.*, 1995).

Em um outro estudo conduzido por MOTOYOSHI e colaboradores (1979), citral demonstrou ser severamente irritante na pele de coelhos, cobaias, porcos (concentração de 100%) e em humanos (32% em acetona).

STELTENKAMP e colaboradores (1980) realizaram um estudo em voluntários, empregando o teste de oclusão da pele com produtos contendo citral. Reações de hipersensibilização foram somente observadas quando utilizou-se preparações com altas concentrações de citral (1 a 5%, em etanol). A exposição ao citral em produtos comerciais (cremes, sabonetes, detergentes, xampus) não induziu hipersensibilização nos voluntários.

Contudo, OPDYKE (1976) verificou que compostos que induzem reações de hipersensibilização em humanos podem ser inócuos quando presentes em óleos voláteis ou em misturas de fragrâncias, conforme observado para o citral.

De acordo com a International Fragrance Association (IFRA) e a Associação Brasileira das Indústrias de Óleos Essenciais, Produtos Químicos Aromáticos, Fragrâncias, Aromas e Afins (ABIFRA), no que se refere aos critérios de utilização de matérias-primas para a preparação de fragrâncias, o citral é classificado como uma substância da categoria S (específica), ou seja, deve ser utilizado se estiver em conformidade com certos critérios de pureza ou em combinação com outros

compostos que impeçam a sensibilização (óleos voláteis, 25% de d-limoneno, ou misturas de terpenos cítricos ou de  $\alpha$ -pineno, por exemplo).

Na monografia do citral, elaborada pela Organization for Economic Co-operation and Development (OECD), pode-se verificar algumas informações importantes no que se refere a sua toxicidade dérmica. O citral é irritante para a pele e não irritante para os olhos, de acordo com os ensaios realizados em coelhos; em humanos, quando empregado a uma concentração de 8% (em vaselina), foi irritante para a pele. Além disso, apresentou baixa toxicidade aguda em roedores e coelhos (dose letal média > 2000 mg/kg e 2250 mg/kg, respectivamente) (OECD, 2001).

Os óleos voláteis, de um modo geral, podem causar irritação, sensibilização e fototoxicidade. Para o óleo volátil de *C. citratus*, poucos estudos foram realizados em relação a sua toxicidade dérmica. A irritabilidade oftálmica de uma solução alcoólica contendo os óleos voláteis de *C. citratus* (2%) e *Plectractus amboinicus* (1%) foi avaliada empregando o teste de Draize. A formulação testada foi classificada como ligeiramente irritante (ROMAY *et al.*, 1996).

### 3.4 NANOCÁPSULAS

Para que ocorra o efeito terapêutico é necessário que a substância ativa, em formas farmacêuticas convencionais, seja liberada e distribua-se nos sítios de ação específicos. Para tal, geralmente empregam-se doses terapêuticas relativamente altas para se obter o efeito desejado, ocorrendo, muitas vezes, aumento dos efeitos adversos e toxicidade dos fármacos.

Em virtude destes problemas, diversas pesquisas estão sendo realizadas na área tecnológica, no sentido de melhorar e controlar o destino de certos fármacos, através de sistemas de liberação adequados. Esses sistemas são denominados de "sistemas de direcionamento ou vetorização de fármacos", os quais permitem o direcionamento do fármaco no seu local específico de ação, evitando a competição com outros tecidos e proporcionando alta concentração do mesmo no órgão ou tecido desejado (SOPPINMATH *et al.*, 2001).

A utilização desses sistemas na área farmacêutica está sendo amplamente estudada, buscando melhorar determinadas propriedades, como: mascaramento de sabor e odor desagradáveis de substâncias ativas (alcalóides e sulfas, por exemplo), proteção de certos fármacos contra a umidade, calor e oxidação (vitaminas, hormônios), prevenção de incompatibilidades entre substâncias de uma mesma formulação e liberação controlada de fármacos (antibacterianos, antineoplásicos, analgésicos, imunossuppressores). Com isso, melhor especificidade de ação, aumento da penetração celular e/ou proteção contra a inativação da molécula ativa, melhor estabilidade, redução dos efeitos indesejados e da toxicidade podem ser obtidos (BARRATT, 2000; GUTERRES *et al.*, 1995; SOPPINMATH *et al.*, 2001).

As nanopartículas são sistemas carreadores submicrométricos de fármacos, de grande interesse na área farmacêutica, caracterizadas por partículas esféricas, com diâmetro inferior a 1  $\mu\text{m}$ , classificadas em nanocápsulas (NC) ou nanoesferas (NS) (SCHAFFAZICK *et al.*, 2003). Do ponto de vista farmacêutico, as nanocápsulas apresentam vantagens, pois possibilitam a incorporação de substâncias

lipofílicas, uma vez que apresentam em sua cavidade central um líquido oleoso (QUINTANAR-GUERRERO *et al.*, 1998).

A inclusão de substâncias ativas em nanopartículas tem sido proposta para diversas classes de fármacos, incluindo anticancerígenos, antiinflamatórios, antiinfeciosos, antiglaucoma, fármacos proteicos e peptídicos (GUTERRES *et al.*, 1995; PINTO-ALPHANDARY *et al.*, 2000; SCHAFFAZICK *et al.*, 2003).

Os métodos de preparação de NC envolvem a polimerização de monômeros alquilcianoacrilatos (polimerização *in situ*) ou a dispersão de polímeros pré-formados (QUINTANAR-GUERRERO *et al.*, 1998; SOPPINMATH *et al.*, 2001; VAUTHIER-HOLTZSCHERER *et al.*, 1991). A polimerização *in situ* apresenta como desvantagem a presença de monômeros e oligômeros teciduais, que possuem elevada toxicidade, bem como, a presença de outros reagentes no meio reacional, possibilitando a formação de ligações covalentes entre o monômero alquilcianoacrilato e o fármaco (NISHIOKA; YOSHINO, 2001; QUINTANAR-GUERRERO *et al.*, 1998).

O método de deposição interfacial de polímero pré-formado foi desenvolvido por FESSI e colaboradores (1989), o qual consiste em uma fase orgânica (acetônica) contendo o fármaco lipofílico, o polímero, o óleo (mistura de triglicerídeos de cadeia média, entre outros) e o tensoativo lipofílico (por exemplo, monoestearato de sorbitano), e uma fase aquosa contendo o tensoativo hidrofílico (por exemplo, polissorbato 80). A fase orgânica é vertida sobre a fase aquosa e as NC são formadas imediatamente pela forte difusão do solvente em água, provocando a emulsificação espontânea da solução oleosa na forma de nanogotículas contendo o fármaco. No final do processo, o solvente é removido por evaporação, sob pressão reduzida. As NC formadas a partir desta técnica apresentam diâmetro médio entre 100 e 500 nm.

Uma nova técnica para a preparação de nanocápsulas foi proposta por QUINTANAR-GUERRERO e colaboradores (1998), denominada emulsificação-difusão, a qual baseia-se na formação inicial de uma emulsão O/A, formada a partir de um óleo, um polímero e um fármaco, empregando-se um solvente parcialmente miscível em

água (carbonato de propileno), e de uma dispersão aquosa de um tensoativo. Esta técnica apresenta como vantagens o uso de pequenas quantidades de solvente, obtenção de partículas com diâmetro entre 80 a 900 nm, controle da espessura da parede polimérica e a possibilidade de formar NC com um núcleo aquoso interno (LEGRAND *et al.*, 1999).

As pesquisas relacionadas à incorporação de substâncias ativas em sistemas nanoparticulados, em especial nanocápsulas, concentram-se na preparação de suspensões que possam ser empregadas pelas vias oral, intramuscular, intravenosa e ocular; entretanto, alguns trabalhos são realizados com o objetivo de incorporar estas suspensões em preparações farmacêuticas de uso tópico, aplicadas na pele.

Nanocápsulas de poli- $\epsilon$ -caprolactona contendo diclofenaco, preparadas pela técnica de nanoprecipitação, foram incorporadas em um hidrogel e avaliadas em relação as suas propriedades físico-químicas e estabilidade. Através dos testes empregados e dos resultados obtidos, pode-se verificar a viabilidade tecnológica da incorporação de sistemas nanoparticulados em uma base semi-sólida; as NC mantiveram-se intactas após o armazenamento a temperatura ambiente, durante três meses (MILÃO *et al.*, 2003).

ALVAREZ-ROMÁN e colaboradores (2001) avaliaram as propriedades físico-químicas e a fotoproteção *in vivo* (cobaias) de géis contendo suspensões de NC com octil metoxicinamato (Parsol MCX<sup>®</sup>), preparadas a partir da técnica de dispersão de polímero pré-formado (poli- $\epsilon$ -caprolactona). Os resultados obtidos demonstraram que a aplicação tópica das preparações contendo as nanopartículas foi mais efetiva em proteger a pele dos animais, após a indução de eritema com luz ultravioleta UVB 365/312 nm, por 15 minutos, quando comparadas com formulações controle (géis contendo o fotoprotetor e nanocápsulas livre de Parsol<sup>®</sup>). Esta maior proteção pode estar relacionada à alta especificidade e área superficial, cobrindo a superfície da pele, melhorando, desta forma, o efeito fotoprotetor.

### 3.5 ESTABILIDADE DE MEDICAMENTOS

O controle de qualidade de medicamentos tem por objetivo assegurar a qualidade e eficácia do produto, garantindo a sua adequabilidade em relação aos fins para os quais se destina. Além disso, as diversas etapas necessárias para o desenvolvimento e a produção de um produto farmacêutico incluem, entre outros, testes de estabilidade, através de condições específicas, descritas em guias de regulamentação.

A necessidade de realizar um estudo de estabilidade em produtos farmacêuticos baseia-se em fatores importantes, relacionados ao paciente, garantindo a administração de produtos estáveis, não deteriorados; aos aspectos legais, que exigem que todos os medicamentos cumpram com suas condições de identidade, efetividade, potência, pureza e segurança durante o período em que se encontram disponíveis no mercado e até o momento de seu uso; e aos aspectos econômicos, que envolvem o fabricante, o médico e o paciente (NUDELMAN, 1975).

A degradação de produtos farmacêuticos pode ser classificada em química, física ou biológica; entretanto, para determinados fármacos, mais do que um modo de degradação pode ocorrer. Em geral, a perda da estabilidade de um produto afeta a sua eficácia e segurança, ou a facilidade de seu uso e aceitabilidade pelo paciente. Desta forma, a perda da potência é o fator mais relevante dos efeitos. Considera-se que um produto é estável quando sua potência está reduzida a não mais que 10% (KOMMANABOYINA; RHODES, 1999; NUDELMAN, 1975).

Outro fator importante é a toxicidade apresentada por certos produtos de degradação, causando, muitas vezes, um dano maior ao paciente do que a perda da eficácia da substância ativa (KOMMANABOYINA; RHODES, 1999; NUDELMAN, 1975).

Os estudos de estabilidade visam estabelecer as condições de conservação e o período de vida útil de produtos farmacêuticos, assegurando a estabilidade do medicamento até o momento de seu uso pelo consumidor, e envolvem



várias fases de desenvolvimento. Estes testes aplicam-se a fármacos e às formas farmacêuticas que os contêm (KOMMANABOYINA; RHODES, 1999; NUDELMAN, 1975).

Assim, durante as etapas de desenvolvimento e dependendo da fase em que o produto se encontra, diferentes fatores podem ser avaliados. Inicialmente, avalia-se a estabilidade intrínseca do fármaco e o desenvolvimento de métodos analíticos capazes de detectar os produtos de degradação. Após, determina-se a formulação mais adequada e verifica-se se a mesma é estável (KOMMANABOYINA; RHODES, 1999).

Muitos fatores podem afetar a estabilidade de um produto, incluindo a estabilidade da(s) substância(s) ativa(s), potencial de interações entre os componentes presentes na formulação, processo de produção, forma farmacêutica, sistema de embalagem, condições ambientais durante o transporte e o armazenamento do produto, tempo entre a produção e o uso pelo consumidor e fatores ambientais (temperatura, radiações, umidade, pressão, solventes, gases atmosféricos, pH, interações, contaminação microbiana) (GRIMN; THOMAE, 1987; KOMMANABOYINA; RHODES, 1999; NUDELMAN, 1975).

A estabilidade do fármaco nas formulações depende dos tipos de materiais utilizados, das condições de transporte e estocagem, do modo de armazenamento pelo consumidor e a estabilidade *in vivo*. Os efeitos de instabilidade de um produto incluem: perda da potência da substância ativa, aumento da concentração da substância ativa, troca da atividade biológica, perda de uniformidade de conteúdo, presença de microrganismos, perda do aspecto, presença de produtos de degradação tóxicos, entre outros fatores (KOMMANABOYINA; RHODES, 1999).

O tempo de vida útil ( $t_{90\%}$ ) de um medicamento é aquele período em que o mesmo mantém-se em condições de uso, conservando as características iniciais, tais como: concentração da substância ativa em, no mínimo, 90% do valor rotulado, eficácia terapêutica, inocuidade, características farmacológicas e organolépticas. É determinado através de estudos de estabilidade, utilizando-se condições experimentais drásticas e,

através dos dados obtidos, extrapolam-se valores para as condições normais ambientais (LACHMAN *et al.*, 2001).

Os estudos de estabilidade compreendem duas etapas de avaliação: testes acelerados e testes confirmatórios (BRASIL, 2005; ICH, 2003a; NUDELMAN, 1975). Os estudos acelerados estão relacionados com os processos de degradação, destinados a aumentar a velocidade de degradação química e modificação física de uma substância e/ou alterações nas características das formas farmacêuticas, usando condições forçadas de armazenamento, com o propósito de monitorar as reações de degradação e prever o prazo de validade nas condições normais de armazenamento. São realizados para avaliar a estabilidade intrínseca do fármaco, através de métodos de envelhecimento acelerado, submetendo-se as formulações farmacêuticas às condições drásticas de temperatura, umidade, luz, entre outros, por um determinado período de exposição. Técnicas analíticas, físico-químicas e microbiológicas são empregadas para avaliar específica e quantitativamente a concentração das substâncias e/ou de seus produtos de degradação (ICH, 2003a; GRIMN; THOMAE, 1987; KOMMANABOYINA; RHODES, 1999; NUDELMAN, 1975). Além disso, estes ensaios têm por finalidade determinar a formulação mais estável entre as propostas para um produto farmacêutico, observando-se sinais de degradação de formas farmacêuticas específicas (NUDELMAN, 1975).

Nos estudos de degradação forçada é possível verificar a sensibilidade da amostra e, também, elucidar produtos e rotas de degradação, além de fornecer informações importantes para o desenvolvimento e validação dos métodos analíticos a serem utilizados nos estudos confirmatórios (NUDELMAN, 1975).

Os estudos de longa duração são realizados com o objetivo de estabelecer as informações necessárias sobre a manipulação, embalagem e rotulagem dos produtos. São realizados com o objetivo de verificar as características físicas, químicas, biológicas e microbiológicas de um produto farmacêutico durante e, opcionalmente, após o prazo de validade esperado. Os resultados são usados para

estabelecer ou confirmar o prazo de validade, e recomendar as condições de armazenamento (BRASIL, 2005; ICH, 2003a).

As condições experimentais para a realização dos testes de estabilidade, estabelecidas pelo International Conference on Harmonisation (ICH) para fins de estudos mundiais e registro de produtos farmacêuticos compreendem (ICH, 2003a):

a) Casos gerais

- teste de longa duração: temperatura  $25\text{ °C} \pm 2\text{ °C}$ ,  $60\% \pm 5\%$  umidade relativa (UR), durante 12 meses;
- teste acelerado: temperatura  $40\text{ °C} \pm 2\text{ °C}$ ,  $75\% \pm 5\%$  UR, por 6 meses.

b) Substâncias estocadas sob refrigeração:

- teste de longa duração: temperatura  $5\text{ °C} \pm 3\text{ °C}$ , durante 12 meses;
- teste acelerado: temperatura  $25\text{ °C} \pm 2\text{ °C}$ ,  $60\% \pm 5\%$  UR, durante 6 meses.

c) Substâncias estocadas em freezer:

- teste de longa duração: temperatura  $-20\text{ °C} \pm 5\text{ °C}$ , durante 12 meses.

Para o registro de produtos de países situados em zonas climáticas quente/seca (zona III) e quente/úmida (zona IV), destinados ao mercado mundial, as condições recomendadas para os testes de longa duração e acelerado são: temperatura de  $30\text{ °C} \pm 2\text{ °C}$ ,  $65\% \pm 5\%$  UR, durante 12 meses (teste de longa duração) e temperatura de  $40\text{ °C} \pm 2\text{ °C}$ ,  $75\% \pm 5\%$  UR, durante 6 meses (ICH, 2003b).

No Brasil, a ANVISA, através da Resolução – RE nº 1, de 29 de julho de 2005, autorizou a publicação do “Guia para a realização de estudos de estabilidade”, apresentando os procedimentos e as condições para a realização deste estudo. Para a concessão do prazo de validade provisório de 24 meses, os estudos acelerados deverão ser conduzidos a:

- temperatura de  $40\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ ,  $75\% \pm 5\%$  UR, durante 6 meses, para produtos armazenados as temperaturas de 15 a  $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ , embalados em recipientes semi-permeáveis;
- temperatura de  $25\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ ,  $60\% \pm 5\%$  UR, para produtos armazenados em refrigerador (temperaturas de 2 a  $8\text{ }^{\circ}\text{C}$ ), embalados em recipientes semi-permeáveis;
- temperatura de  $40\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$  e  $25\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ , para as formas farmacêuticas armazenadas as temperaturas de 15 a  $30\text{ }^{\circ}\text{C}$  e 2 a  $8\text{ }^{\circ}\text{C}$ , respectivamente, embaladas em recipientes impermeáveis;
- temperatura de  $-20\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 5\text{ }^{\circ}\text{C}$ , para todas as formas farmacêuticas armazenadas a temperatura de  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

Os estudos de estabilidade de longa duração devem ser realizados a temperatura de  $30\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$  e  $5\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 3\text{ }^{\circ}\text{C}$ , para produtos armazenados as temperaturas de 15 a  $30\text{ }^{\circ}\text{C}$  e de 2 a  $8\text{ }^{\circ}\text{C}$ , respectivamente (BRASIL, 2005).

O prazo de validade dos produtos deverá ser confirmado mediante a apresentação de um estudo de estabilidade de longa duração, realizado durante 24 meses (BRASIL, 2005).

Os testes de estabilidade deverão ser conduzidos com o produto em sua embalagem original e os métodos utilizados para sua avaliação deverão contemplar determinações físico-químicas e microbiológicas, quando necessário, determinação qualitativa e quantitativa da(s) substância(s) ativa(s), bem como de subprodutos e/ou produtos de degradação, utilizando metodologia analítica adequada e validada (BRASIL, 2005; ICH, 2003a).

### 3.5.1 Fotoestabilidade

A reação fotoquímica é uma fonte importante de degradação, não somente no período de armazenamento, mas durante a produção do medicamento (YOSHIOKA *et al.*, 1994).

É um processo complexo, devido ao número de variáveis envolvidas. Inicialmente ocorre a absorção direta de energia pelas moléculas e formação de produtos intermediários (radicais livres) que dão origem às reações subseqüentes. Diferentes tipos de reações podem ser inicializadas, como redução, hidrólise, oxidação e redução, isomerização, rearranjo de anéis, modificação ou polimerização, e fatores como a intensidade e o comprimento de onda da radiação, assim como o tamanho e a forma do recipiente que contém a amostra podem influenciar na velocidade de reação. As moléculas da substância podem ser afetadas direta ou indiretamente pela radiação, dependendo de como a energia radiante é transferida para a mesma. A reação fotoquímica ocorre quando as moléculas que absorvem as radiações são os reagentes da reação principal; por outro lado, quando as moléculas que absorvem a radiação não participam, diretamente, da reação (excipientes, impurezas ou produtos de degradação, por exemplo), mas transferem energia para outras moléculas, tem-se um efeito fotossensibilizante (indireto) (LACHMAN *et al.*, 2001; NUDELMAN, 1975; TONNESEM, 2001).

É importante salientar que a estabilidade fotoquímica da substância, isoladamente, ou em um solvente puro, pode não prever a absorção ou a estabilidade da mesma na formulação, uma vez que o tipo de preparação pode influenciar na fotodecomposição da substância (TONNESEM, 2001).

A fotoestabilidade de produtos farmacêuticos é assegurada pelo uso de fontes de luz que simulem a luz solar ou da sala (YOSHIOKA *et al.*, 1994). De acordo com as recomendações descritas pelos guias, duas fontes de luz podem ser utilizadas em estudos de fotoestabilidade: 1) fonte com emissão padrão similar ao D65 (luz do dia externa, ISO 10977)/ID65 (luz do dia indireta), a qual pode ser obtida com lâmpadas

fluorescentes combinadas com lâmpadas com emissão ultravioleta (UV) ou visível, xenônio ou metal-haletos, com filtros de vidro que permitam emissão ao redor de 320 nm; 2) lâmpada branca fluorescente fria, similar a ISO 10977, e fonte de luz UV fluorescente, que possua uma distribuição espectral de 320 a 400 nm, e emissão máxima de energia entre 350 e 370 nm (ICH, 1996b).

Os estudos de fotoestabilidade de substâncias poderão ser realizados em duas etapas: teste de degradação forçada, com o objetivo de avaliar a fotosensibilidade do material e seus produtos de degradação, empregando a substância, isoladamente, ou em solução/suspensão, e submetendo-a a condições variadas de exposição, de acordo com sua sensibilidade à radiação luminosa (ICH, 1996b); testes confirmatórios, nos quais as amostras deverão ser expostas a não menos que 1,2 milhões de lux.hora, integrados a uma energia de ultravioleta próxima de não menos que 200 watt horas/m<sup>2</sup>, para permitir uma comparação direta entre a substância ativa e o produto (ICH, 1996b).

Uma das condições para que a reação fotoquímica ocorra é que a molécula tenha máximos de absorção de luz na região de comprimento de onda da fonte de radiação. Praticamente, todos os fármacos empregados nas preparações farmacêuticas apresentam máximos de absorção na região do UV (NUDELMAN, 1975). Face a estas observações, alguns estudos de fotoestabilidade são realizados empregando-se lâmpadas germicidas com emissão em 254 nm.

CARDOSO (2000) avaliou a estabilidade fotoquímica da terbinafina, utilizando duas fontes de luz, uma com emissão a 254 nm e outra com espectro de emissão entre 320 e 400 nm. Os resultados obtidos permitiram verificar que a terbinafina é sensível à irradiação da lâmpada UV 254 nm, obtendo-se dois produtos de degradação, sendo o principal identificado, como o isômero *cis* da terbinafina. Amostras de comprimidos e cremes contendo terbinafina foram, também, submetidas à fotodegradação e verificou-se que os cremes apresentaram maior instabilidade.

### 3.5.2 Cinética química

Os métodos utilizados para prever o período de vida útil de um medicamento baseiam-se em reações físico-químicas, e o processo de degradação envolve uma ou mais reações, cuja velocidade pode ser calculada. O estudo da cinética de degradação é fundamental para o estudo de estabilidade de preparações farmacêuticas, e tem como principais objetivos: obter, experimentalmente, os dados cinéticos; correlacioná-los, por equações matemáticas; propor o mecanismo das reações de degradação; estabelecer condições para acelerar ou diminuir a velocidade de reação (NUDELMAN, 1975).

Os processos de envelhecimento acelerado fundamentam-se na determinação da velocidade de degradação a temperaturas elevadas, objetivando, também, verificar o prazo de validade ou tempo de vida útil ( $t_{90\%}$ ) de um produto, à temperatura ambiente. A determinação do  $t_{90\%}$  é importante, uma vez que, geralmente, um medicamento é considerado estável durante o período no qual o teor de fármaco não seja reduzido em mais que 10% (NUDELMAN, 1975).

Os primeiros estudos foram desenvolvidos por Garret e Carper, em 1955. A estabilidade em condições ambientais pode ser estimada a partir de dados obtidos a temperaturas elevadas, pela aplicação de leis físico-químicas, utilizando a equação de Arrhenius para determinar o prazo de validade do medicamento; Kennon, em 1964, desenvolveu um método baseado na construção de um modelo de degradação que permite verificar o  $t_{90\%}$  (LACHMAN *et al.*, 2001; NUDELMAN, 1975). O método de Amirjahed utiliza a velocidade média de degradação, correspondente a cada temperatura experimental, para calcular o tempo de vida útil e, a partir desses dados, elaboram-se um gráfico, pelo qual, obtém-se, por extrapolação, o  $t_{90\%}$  a 25 °C (AMIRJAHED, 1977).

As reações de degradação nos medicamentos ocorrem a velocidades definidas, são de natureza química e compreendem: hidrólises, oxidações, isomerizações, racemizações, rearranjos, dimerizações, rupturas de ligações e

polimerizações, influenciadas por fatores como: concentração dos reagentes, temperatura, pH, radiações, presença de catalizadores, entre outros (LACHMAN *et al.*, 2001; NUDELMAN, 1975).

As velocidades de reação podem classificar-se como de ordem zero, primeira ordem ou segunda ordem, de acordo com os expoentes que afetam as concentrações dos reagentes (LACHMAN *et al.*, 2001; NUDELMAN, 1975). A ordem de reação é uma grandeza experimental, determinada a partir da lei de velocidade da reação química, verificando-se a concentração de amostras retiradas no decorrer da reação química (NUDELMAN, 1975).

A reação de ordem zero ocorre quando a velocidade de reação é independente da concentração da substância ativa e o fator limitante pode ser, por exemplo, a solubilidade ou a absorção da luz em certas reações fotosensíveis. Se os resultados dos estudos de estabilidade seguirem uma reação de ordem zero, um gráfico de concentração (C) em função do tempo (t) dará origem a uma reta, cuja inclinação corresponde à constante de velocidade de reação (K). Quando as velocidades de reação dependem da concentração do reagente, a reação segue uma cinética de primeira ordem. Neste caso, obtém-se uma reta quando o logaritmo da concentração ( $\log C$ ) é representado em função do tempo (t). A cinética de segunda ordem ocorre quando a velocidade de reação depende da concentração de dois reagentes, ou a segunda potência da concentração de um deles. A representação gráfica para este tipo de reação é o inverso da concentração ( $1/C$ ) em função do tempo (t), obtendo-se uma reta (LACHMAN *et al.*, 2001; NUDELMAN, 1975).

A determinação da ordem de reação é realizada a partir de procedimentos analíticos (químicos, físicos ou microbiológicos), empregados para determinar específica e quantitativamente a concentração da substância de interesse (NUDELMAN, 1975).



### 3.5.3 Óleos voláteis

Os óleos voláteis são caracterizados por apresentar moléculas instáveis, sendo facilmente suscetíveis às reações de degradação. A degradação dos componentes tende a ocorrer após um prolongado período de armazenamento ou em função de inadequadas condições de estocagem (TISSERAND, 1996).

Os principais fatores responsáveis pela degradação dos óleos voláteis são o oxigênio atmosférico, o calor e a luz, e reações de oxidação, polimerização podem ocorrer, ocasionando mudanças nas suas características (sabor, cor e viscosidade, por exemplo). Estes processos podem levar à formação de produtos de degradação, pela decomposição química de um ou mais componentes presentes no óleo volátil e, com isso, ocasionando a perda da eficácia e da segurança do óleo. Além disso, a degradação reduz o valor comercial dos óleos voláteis, podendo, também, constituir um fator de risco quando empregados externamente, provocando reações alérgicas ou irritantes (óleo de terebentina e óleos de pinho, por exemplo) (TISSERAND, 1996). Reações alérgicas causadas por óleos ricos em terpenos (pinho, junípero, cipreste e frutas cítricas) foram relatadas, devido a hidroxiperóxidos formados durante a estocagem (TISSERAND; BALACS, 1995 *apud* SAWAMURA *et al.*, 2004); os produtos da degradação oxidativa do óleo de melaleuca (peróxidos e epóxidos) causaram reações de hipersensibilidade na pele (HAUSEN *et al.*, 1999 *apud* SAWAMURA *et al.*, 2004).

---

TISSERAND, R.; BALACS, T. **Essential oil safety**. London: Churchill Livingstone, 1995 *apud* SAWAMURA, M.; SON, U-S.; CHOI, H-S.; KIM, M-S.L.; PHI, N.T.L.; FEARS, M.; KUMAGAI, C. Composition changes in commercial lemon essential oil for aromatherapy. **Int. J. Aromather** (Provence), v. 14, p. 24-36, 2004.

HAUSEN, B.; REICHLING, J.; HARKENTHAL, M. Degradation products of monoterpenes are the sensitizing agents in tea tree oil. **Am. J. Contact Dermat** (Philadelphia), v. 10, p. 68-77, 1999 *apud* SAWAMURA, M.; SON, U-S.; CHOI, H-S.; KIM, M-S.L.; PHI, N.T.L.; FEARS, M.; KUMAGAI, C. Composition changes in commercial lemon essential oil for aromatherapy. **Int. J. Aromather** (Provence), v. 14, p. 24-36, 2004.

Para prevenir possíveis reações de degradação, recomenda-se conservar os óleos voláteis dessecados e livres de impurezas, acondicionando-os em frascos de pequeno volume, em embalagens neutras (aço inoxidável, vidro âmbar), completamente cheios e hermeticamente fechados, estocados em baixas temperaturas (como refrigerador ou *freezer*) ou em atmosfera de nitrogênio (TISSERAND, 1996).

Pesquisas envolvendo estudos de estabilidade do óleo volátil de *C. citratus* são pouco descritas na literatura. Maiores informações são obtidas em relação ao citral, seu principal componente.

FREEBURG e colaboradores (1994) avaliaram a estabilidade de emulsões e bebidas contendo o óleo volátil de limão e citral, armazenadas às temperaturas de 4, 25, 35 e 45 °C. A degradação de citral é fortemente afetada pela temperatura: em bebidas armazenadas a 45 °C, citral degradou quase que completamente, após 40 horas de exposição; entretanto, quando armazenadas a 4 °C, a concentração de citral diminuiu cerca de 30% após 20 dias de armazenamento. Além disso, verificou-se que a degradação de citral é pH dependente, sendo mais rápida para as amostras que apresentavam pH 2,7, em comparação com amostras de pH 3,3, para todas as temperaturas. Nestas condições, citral é bastante instável e se deteriora rapidamente. Os principais produtos de degradação identificados nas bebidas foram  $\rho$ -cimeno e  $\alpha$ -terpineol, este formado não somente pela degradação de citral, mas, também, pelos outros terpenos. A formação de  $\rho$ -cimeno aumentou, significativamente, em bebidas de baixo valor de pH (2,7), indicando a dependência do pH para a formação deste composto.

Um outro estudo, realizado por SAWAMURA e colaboradores (2004), demonstrou, também, um aumento na concentração de  $\rho$ -cimeno no óleo volátil de limão, associada à degradação de  $\gamma$ -terpineno e citral, quando amostras de óleo volátil foram armazenadas à temperatura de 25 °C, com aeração (3 min/dia).

Estudos de estabilidade de extratos fluidos a 70% de *C. citratus* foram realizados por CHANFRAU e colaboradores (2003), verificando-se o comportamento

das amostras frente ao calor (45 °C, por 30 dias), à luz (luz natural, 30 dias) e ao pH (ácido e básico). As amostras foram avaliadas em relação a suas características organolépticas e ao teor de citral, por cromatografia em camada delgada. Os resultados obtidos permitiram verificar que o produto sofreu variações importantes em relação ao teor de citral quando submetido aos testes acelerados de estabilidade. A concentração de citral diminuiu cerca de 40% e 30% quando os extratos fluidos foram expostos ao calor e à luz, respectivamente. Após 30 dias de exposição à luz natural observou-se, também, a formação de um provável produto de degradação. Em meio fortemente ácido (HCl 0,1 M), após 72 horas de exposição, a degradação de citral foi total e a amostra apresentava partículas em suspensão, além da formação de um precipitado escuro; resultados semelhantes foram obtidos em meio fortemente básico (NaOH 0,1 M), entretanto, não se observou partículas suspensas e precipitado na solução.



---

## **4. PARTE EXPERIMENTAL**



#### 4.1 MATÉRIAS-PRIMAS

As substâncias químicas de referência e as matérias-primas empregadas neste trabalho estão descritas a seguir:

- **Substâncias químicas de referência (SQR)**
  - citral, pureza de 95%, adquirido da Sigma Aldrich (Alemanha)
  - nistatina, com 5552 UI/mg de potência (Schemicals<sup>®</sup>)
  
- **Óleo volátil**
  - óleo volátil de *Cymbopogon citratus*, adquirido da Destilaria Maripá – PR, em setembro de 2001 (validade 3 anos)
  
- **Excipientes**
  - álcool cetílico (Delaware, Porto Alegre)
  - álcool cetosteárico etoxilado (Eumulgin B2<sup>®</sup> – Delaware, Porto Alegre)
  - butil-hidroxi-tolueno (BHT – Delaware, Porto Alegre)
  - carboxipolimetileno (Carbopol 940<sup>®</sup> – Delaware, Porto Alegre)
  - imidazolidiniluréia (Germall 115<sup>®</sup> – Delaware, Porto Alegre)
  - monoestearato de glicerila (Henrifarma, São Paulo)
  - monoestearato de sorbitano (Span 60 – Delaware, Porto Alegre)
  - oleato de isodecila (Cetiol V<sup>®</sup> – Delaware, Porto Alegre)
  - poli(ácido metacrílico-co-metacrilato de metila) (Eudragit S100<sup>®</sup> – Almapal, São Paulo)
  - poliacrilato de glicerila (Lubragel MS<sup>®</sup> – Delaware, Porto Alegre)

- polissorbato 80 (Delaware, Porto Alegre)
- propilenoglicol (Delaware, Porto Alegre)
- trietanolamina (Alpha Química, Porto Alegre)



---

## 4.2 MÉTODOS

### 4.2.1 ÓLEO VOLÁTIL

#### 4.2.1.1 Determinação do teor de citral por cromatografia gasosa (CG) (F. Bras. IV, 2003)

A separação e quantificação dos principais componentes presentes no óleo volátil foram realizadas através de cromatografia gasosa capilar, em um cromatógrafo gasoso Perkin Elmer (Autosystem XL, Shelton, USA), equipado com detector de ionização de chamas (CG/DIC), utilizando como gás de arraste nitrogênio (1 ml/min), a uma pressão de 80 kPa; coluna capilar de 30 m de comprimento e 0,25 µm de diâmetro interno, preenchida com polidifenildimetilsiloxano, com espessura de filme de 0,25 µm; temperatura da coluna de 60 °C a 300 °C, a 15 °C por minuto (total de 20 minutos); temperatura do injetor a 220 °C e temperatura do detector a 250 °C. O óleo volátil foi diluído na razão de 2:100, em éter etílico, e a quantidade de solução de amostra injetada foi de 1 µl.

As concentrações relativas, em percentagens, foram obtidas por integração eletrônica, e a caracterização dos constituintes foi baseada no índice de retenção linear (Índice de Kovats), segundo a expressão:

$$IK = 100xn + \frac{100x (tr_x - tr_z)}{(tr_{z+1} - tr_z)}$$

Onde:

n = número de átomos de carbono do alcano de menor peso molecular

$tr_x$  = tempo de retenção do composto "x" (intermediário a  $tr_z$  e  $tr_{z+1}$ )

$tr_z$  = tempo de retenção do alcano com "n" carbonos

$tr_{z+1}$  = tempo de retenção do alcano com "n + 1" carbonos

#### 4.2.1.2 Avaliação da atividade antifúngica do óleo volátil e do citral (F. Bras. IV, 1988; SCHUCK *et al.*, 2001)

A avaliação da atividade antifúngica do óleo volátil de *C. citratus* e de seu principal componente, citral, foi realizada pelo método microbiológico de difusão em ágar com discos de papel, frente a oito espécies de *Candida*: *Candida albicans* ATCC 10231, *Candida albicans* ATCC 18804, *Candida albicans* IC-I (isolado clínico), *Candida albicans* IC-II, *Candida glabrata* ATCC 2001, *Candida krusei* ATCC 6258, *Candida tropicalis* ATCC 750 e *Candida parapsilosis* ATCC 22019.

Para a manutenção das culturas foi empregado ágar Sabouraud dextrose 4% (Merck), em tubo inclinado, bem como para o preparo da camada base e dos inóculos. Solução salina estéril (0,9%) foi utilizada para preparar a suspensão das leveduras.

Os materiais foram previamente esterilizados, a vidraria em estufa, a 180 °C, por duas horas, e os meios de cultura e demais soluções em autoclave, a 120 °C, por 15 minutos.

As cepas de *Candida* spp. foram cultivadas em ágar Sabouraud dextrose 4%, a 25 °C, por 48 horas. Após este período, preparou-se a suspensão dos microrganismos apresentando  $25\% \pm 2\%$  de transmitância, a 580 nm, em fotocolorímetro (Analyser 800, São Paulo, Brasil). O inóculo utilizado para cada levedura foi na concentração de 1% (v/v).

O padrão utilizado foi a nistatina, na concentração de 0,3 mg/ml, preparada em água estéril. A nistatina foi dissolvida, primeiramente, em metanol (3,0 mg/ml) para posterior obtenção da solução final.

Os discos de papel foram previamente impregnados com as amostras de óleo volátil, citral, solução padrão e branco (20 µl em cada disco), mantidos em dessecador a vácuo, por 24 horas, em geladeira. Para a preparação do branco

(controle negativo) utilizou-se as mesmas proporções de metanol e água empregadas na obtenção da solução padrão.

As alíquotas de óleo volátil e de citral testadas foram: 2,0; 4,0 e 8,0  $\mu$ l. Para cada quantidade empregada utilizou-se seis discos de papel, colocados, individualmente, em placas de Petri.

Em capela de fluxo laminar, distribuiu-se, por placa, 20 ml de meio de cultura. Após solidificação dessa camada base, adicionou-se 5 ml de inóculo, deixando-se solidificar novamente. A seguir, os discos de papel contendo as amostras foram adicionados. As placas foram incubadas à temperatura de  $35\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ , por 24 horas e, após este período, realizou-se a leitura do diâmetro dos halos de inibição, com auxílio de paquímetro digital (Starret<sup>®</sup> - Série 727, Itu, Brasil).

#### 4.2.1.3 Resultados e discussão

A composição química do óleo volátil de *C. citratus* é caracterizada pela presença de compostos monoterpênicos, dentre eles, hidrocarbonetos, cetonas, aldeídos e ésteres. A qualidade do óleo volátil é determinada pelo seu conteúdo em aldeídos, principalmente citral, que deverá encontrar-se na faixa de 70 a 85%, e, de acordo com a Farmacopéia Brasileira (2003), o óleo volátil deve ser constituído de, no mínimo, 60% de citral.

O óleo volátil de *C. citratus* apresentou coloração amarelo clara, odor forte e característico.

Os principais componentes do óleo volátil encontrados na amostra comercial foram: neral (31,70%) e geranial (44,24%), além de outros compostos, como geraniol, acetato de geranila e  $\beta$ -mirceno, em concentrações menores.

A análise da amostra comercial do óleo volátil por cromatografia gasosa demonstrou um teor de citral (neral e geranial) de 75,94%. Desta forma, verifica-se que a concentração de citral obtida encontra-se de acordo com os limites estipulados na literatura, e de acordo com os experimentos previamente realizados (RAUBER 2001). Neste trabalho, amostras do óleo volátil, empregadas no desenvolvimento de formulações semi-sólidas, foram obtidas da planta coletada em Viamão/RS, as quais apresentaram um teor de citral de 75 a 81%.

É importante salientar que para dar continuidade aos estudos de desenvolvimento de tais formulações, necessitava-se de grandes quantidades de óleo, o que levou a adquiri-lo comercialmente. Neste sentido, a qualidade do óleo foi verificada em relação ao seu componente majoritário, ao qual é, principalmente, atribuída sua atividade antimicrobiana. Assim, a concentração de citral presente no óleo volátil foi determinada, experimentalmente, e situou-se na faixa de 70 a 80%.

Além de determinar o teor de citral, verificou-se a potência do óleo volátil em relação à espécie de *C. albicans* ATCC 10231, empregada como referência em trabalhos realizados com o mesmo, bem como frente a outras espécies do gênero *Candida*, buscando, também, avaliar a atividade antifúngica de seu principal componente.

Os resultados obtidos na avaliação da atividade antifúngica do óleo volátil e do citral encontram-se nas Tabelas 4.1 e 4.2.

**TABELA 4.1** – Valores dos diâmetros dos halos de inibição (mm) obtidos na avaliação da atividade antifúngica do óleo volátil de *C. citratus*, frente a espécies de *Candida*.

Espécie	Diâmetro dos halos de inibição (mm)*				
	Quantidade de óleo testada (µl)			Controles (20 µl)	
	2,0	4,0	8,0	P	B
<i>C. albicans</i> ATCC 10231	18,6	27,4	> 40	18,8	R
<i>C. albicans</i> ATCC 18804	13,3	22,5	> 35	18,8	R
<i>C. albicans</i> IC I	12,6	27,3	> 40	17,8	R
<i>C. albicans</i> IC II	14,4	27,3	> 50	17,9	R
<i>C. glabrata</i> ATCC 2001	19,3	25,1	> 30	17,3	R
<i>C. krusei</i> ATCC 6258	12,3	14,4	19,6	15,4	R
<i>C. parapsilosis</i> ATCC 22019	8,9	18,3	28,8	13,5	R
<i>C. tropicalis</i> ATCC 750	12,8	19,2	29,5	15,6	R

\*: média de seis determinações; P = solução nistatina (0,3 mg/ml); B = branco; R = resistente

**TABELA 4.2** – Valores dos diâmetros dos halos de inibição (mm) obtidos na avaliação da atividade antifúngica do citral, frente a espécies de *Candida*.

Espécie	Diâmetro dos halos de inibição (mm)*				
	Quantidade de óleo testada (µl)			Controles (20 µl)	
	2,0	4,0	8,0	P	B
<i>C. albicans</i> ATCC 10231	19,6	27,8	> 40	18,6	R
<i>C. albicans</i> ATCC 18804	12,5	20,6	> 35	18,8	R
<i>C. albicans</i> IC I	14,8	20,3	> 40	17,8	R
<i>C. albicans</i> IC II	14,5	26,1	> 35	18,5	R
<i>C. glabrata</i> ATCC 2001	18,8	22,5	> 30	17,3	R
<i>C. krusei</i> ATCC 6258	12,3	14,3	19,7	15,1	R
<i>C. parapsilosis</i> ATCC 22019	9,0	18,1	27,5	14,0	R
<i>C. tropicalis</i> ATCC 750	12,4	22,2	32,6	18,1	R

\*: média de seis determinações; P = solução nistatina (0,3 mg/ml); B = branco; R = resistente

Na avaliação da atividade antifúngica do óleo volátil e do citral os resultados obtidos demonstraram que as amostras apresentaram atividade frente todas as espécies de *Candida* testadas. Uma maior atividade foi observada para as espécies de *C. albicans*. Além disso, as cepas de *C. albicans* ATCC 10231 e IC II mostraram-se mais sensíveis, uma vez que com 8 µl de óleo volátil verificou-se uma inibição parcial do microrganismo, observando-se o crescimento do mesmo somente nas extremidades da placa de Petri.

Por outro lado, observou-se que a espécie mais resistente é *C. krusei*, obtendo-se halos de inibição inferiores às demais espécies empregadas, para todas as quantidades de óleo utilizadas. Para a espécie de *C. parapsilosis* verificou-se uma pequena atividade antifúngica empregando-se 2,0 µl do óleo; entretanto, aumentando-se a concentração do mesmo, observou-se um acentuado aumento nos halos de inibição. Esta menor atividade foi, também, verificada para o antifúngico padrão, a nistatina.

É importante ressaltar que, empregando-se 4,0 e 8,0 µl de óleo volátil (ou de citral) observa-se, além do halo de inibição formado, uma diminuição do crescimento da levedura ao redor do mesmo. Além disso, os halos formados são assimétricos, dificultando, desta forma, a sua medida. Estas observações podem estar relacionadas à volatilização do óleo na placa, obtendo-se diferentes concentrações de vapor em determinadas regiões da mesma, resultando em halos pouco nítidos.

Ainda, é possível verificar que o efeito inibitório do óleo volátil sobre a levedura de *C. albicans* relaciona-se a sua concentração. Empregando-se 8 µl de óleo tem-se uma inibição parcial, havendo a formação de um halo com diâmetro médio superior a 40 mm; em outros trabalhos, utilizando-se 20 µl de óleo, verificou-se a inibição total do crescimento do fungo (RAUBER, 2001; SCHUCK *et al.*, 2001).

Comparando-se a atividade antifúngica do óleo volátil com a nistatina, verifica-se uma maior atividade demonstrada pelo mesmo. Empregando-se uma quantidade de 20 µl da solução de nistatina (que corresponde a 6,0 µg de fármaco) os

halos de inibição formados foram inferiores quando se utilizou 4,0 µl de óleo volátil e de citral (que corresponde a, aproximadamente, 3,5 µg) para as diferentes espécies de *Candida*, com exceção de *C. krusei* (Tabelas 4.1 e 4.2). Da mesma forma, uma maior atividade do óleo volátil em relação à nistatina foi verificada para todas as leveduras quando quantidades equivalentes de nistatina e de citral (6 µg) foram utilizadas, empregando-se 8 µl de óleo volátil.

O estudo comparativo da atividade antifúngica do óleo volátil e do citral demonstrou, para todas as espécies de leveduras utilizadas, atividade semelhante entre as amostras, uma vez que os halos de inibição obtidos, para as diferentes quantidades testadas, foram similares.

Adicionalmente, algumas pesquisas têm demonstrado a atividade antifúngica do óleo volátil frente a espécies de *Candida*, destacando-se, a *C. albicans* (ABE *et al.*, 2003; CARMO *et al.*, 1998; MISHRA; DUBEY, 1994). Nos ensaios de diluição em ágar, a concentração inibitória mínima foi de 0,05-0,06% (v/v) (HAMMER *et al.*, 1999; ONAWUNMI, 1989).

Ainda, os resultados obtidos neste trabalho assemelham-se aos encontrados por RAUBER (2001) em relação à espécie de *C. albicans* ATCC 10231 (Tabela 4.3). Verificou-se que pequenas variações na composição química do óleo, decorrentes do seu local e condições de cultivo, não interferiram na sua atividade antifúngica. A amostra comercial, apesar de apresentar um menor teor de β-mirceno (1,2%), por exemplo, demonstrou ação antifúngica semelhante, em comparação com amostras de óleo contendo de 8 a 13 % deste componente. Assim, pode-se comprovar que a amostra comercial de óleo volátil é adequada para ser empregada na preparação das formulações desenvolvidas neste trabalho.

**TABELA 4.3** – Comparação dos resultados obtidos por RAUBER (2001) na avaliação da atividade antifúngica do óleo volátil de *C. citratus* frente à *C.albicans* ATCC 10231.

Quantidade de óleo testada ( $\mu$ l)	Diâmetro dos halos de inibição (mm)	
	Amostras coletadas 1998 a 2000 (Viamão/RS)	Amostra comercial (Destilaria Maripá)
2,0	13 a 18	18,6
4,0	> 25	27,4
8,0	IP	IP

IP = inibição parcial (halo com diâmetro médio superior a 40 mm)

De posse dos resultados obtidos, pode-se verificar a importante atividade antifúngica apresentada pelo óleo volátil de *C. citratus* para todas as espécies de *Candida* analisadas, confirmando, desta forma, o seu potencial efeito antifúngico. Além disso, evidencia-se seu amplo espectro de ação, exercendo efeito inibitório no crescimento de cepas albicans e não-albicans, estas, também, responsáveis por causar candidíases superficiais, mas com menor frequência quando comparadas com a incidência de *C. albicans*. Comparando-se os halos de inibição obtidos para as cepas de *C. albicans* ATCC e isolados clínicos, verifica-se que os valores obtidos foram semelhantes. Estes resultados demonstram, novamente, o importante efeito inibitório exercido pelo óleo volátil, uma vez que cepas isoladas de pacientes podem apresentar uma maior virulência e, conseqüentemente, maior resistência a determinados antifúngicos. Ainda, observa-se que a presença de citral é fundamental para a ação antifúngica, sendo o principal componente responsável por tal atividade, corroborando com os dados obtidos da literatura (ABE *et al.*, 2003; INOUYE, 2003; ONAWUNMI *et al.*, 1984; ONAWUNMI, 1989).



## 4.2.2 SUSPENSÃO DE NANOCÁPSULAS (NC)

### 4.2.2.1 Preparação (FESSI *et al.*, 1989)

As suspensões de NC de poli(ácido metacrílico-co-metacrilato de metila) (Eudragit S100<sup>®</sup>) contendo o óleo volátil de *C. citratus* foram preparadas através do método de deposição interfacial de polímero pré-formado, apresentando os constituintes descritos na Tabela 4.4.

**TABELA 4.4** – Componentes empregados na preparação das suspensões de NC.

Componentes		Quantidade
Fase orgânica	óleo volátil	2,5 g
	Span 60	0,1125 g
	Eudragit S100 <sup>®</sup>	0,15 g
	acetona	40 ml
Fase aquosa	Tween 80	0,1125 g
	água	40 ml

A fase orgânica, após completa mistura dos componentes, foi vertida, lentamente, sobre a fase aquosa (previamente homogeneizada), mantida sob agitação moderada, por 10 minutos, à temperatura ambiente. As NC foram formadas, imediatamente, após a mistura. A seguir, a suspensão coloidal foi submetida à evaporação, a temperatura de 30-35 °C, em evaporador rotatório (Büchi), para a eliminação do solvente orgânico, a um volume final de 40 ml. As suspensões foram preparadas em triplicata.

#### **4.2.2.2 Caracterização físico-química das nanopartículas**

##### **4.2.2.2.1 Determinação do pH**

A determinação do pH foi realizada em potenciômetro previamente calibrado (Digimed DM-20, São Paulo, Brasil) com soluções tampão pH 4,0 e 7,0, diretamente nas suspensões coloidais, após a preparação. Os resultados representam a média de três amostras.

##### **4.2.2.2.2 Determinação do diâmetro médio das partículas**

O diâmetro médio das partículas coloidais foi determinado por espectroscopia de auto-correlação pela difusão de raio monocromático laser (goniometer BI-200M/versão 2.0, Brookhaven Instruments, Holtsville, USA). As análises foram realizadas no Laboratório de Instrumentação e Dinâmica Molecular (Departamento de Química – UFRGS). Os resultados foram expressos em nanômetros (nm).

##### **4.2.2.2.3 Determinação do teor de citral presente nas suspensões de NC**

A concentração total de citral, principal componente do óleo volátil, presente nas nanoestruturas, foi determinada mediante a dissolução das NC, empregando-se etanol. Para este fim, foram transferidas alíquotas de 1,0 ml de cada suspensão para balões volumétricos de 20 ml, completando-se o volume com etanol. A partir desta solução, transferiu-se 1,0 ml para balão volumétrico de 25 ml e, após, o volume foi completado com *n*-hexano, e desta, transferiram-se 2,0 ml para balão volumétrico de 10 ml, completando-se o volume com *n*-hexano, a fim de obter soluções com concentração teórica de, aproximadamente, 19 µg/ml. A quantificação foi realizada por CLAE, de acordo com as condições experimentais descritas no item 4.2.4.2. Esta

determinação foi realizada após a preparação das suspensões. Os resultados foram expressos em concentração total de citral (teor %) e representam a média de três amostras.

#### **4.2.2.2.4 Avaliação morfológica das suspensões de NC**

Uma gota da suspensão de NC foi colocada sobre um suporte de cobre (formvar) com a face da película voltada para baixo, deixando-se em contato durante dois minutos. Retirou-se a grade, eliminando o excesso de amostra com papel filtro. Após, a grade foi colocada em contato com uma solução aquosa de acetato de uranila a 2%, durante três minutos. O excesso de acetato de uranila foi retirado com papel filtro, deixando-se secar. As NC foram examinadas por microscopia eletrônica de transmissão (MET) (Microscópio Eletrônico de Transmissão JEOL - JEM 2010). As análises foram realizadas no Centro de Microscopia Eletrônica da UFRGS.

#### **4.2.2.3 Resultados e discussão**

Com objetivo de incorporar o óleo volátil em partículas poliméricas, foram preparadas suspensões de NC pelo método de nanoprecipitação (FESSI *et al.*, 1989), utilizando-se como polímero Eudragit S100<sup>®</sup> e o óleo volátil para a formação do núcleo oleoso. O Eudragit S100<sup>®</sup> é um copolímero do ácido metacrílico e metacrilato de metila e é utilizado em formulações farmacêuticas como revestimento entérico (KIBBE, 2000) e na preparação de nanopartículas (BECK *et al.*, 2004; SCHAFFAZICK *et al.*, 2005). Sua escolha baseou-se em seu menor custo quando comparado com os outros polímeros utilizados na preparação destes sistemas, como a poli- $\epsilon$ -caprolactona. As nanopartículas foram, então, avaliadas em relação a suas propriedades físico-químicas, e posteriormente, incorporadas em uma base semi-sólida.

É importante salientar que a incorporação de óleos voláteis em NC não é descrita na literatura e a obtenção de tais preparações objetivou melhorar aspectos relacionados a sua estabilidade, protegendo-o de possíveis reações de degradação, decorrentes de fatores externos, como, por exemplo, a oxidação.

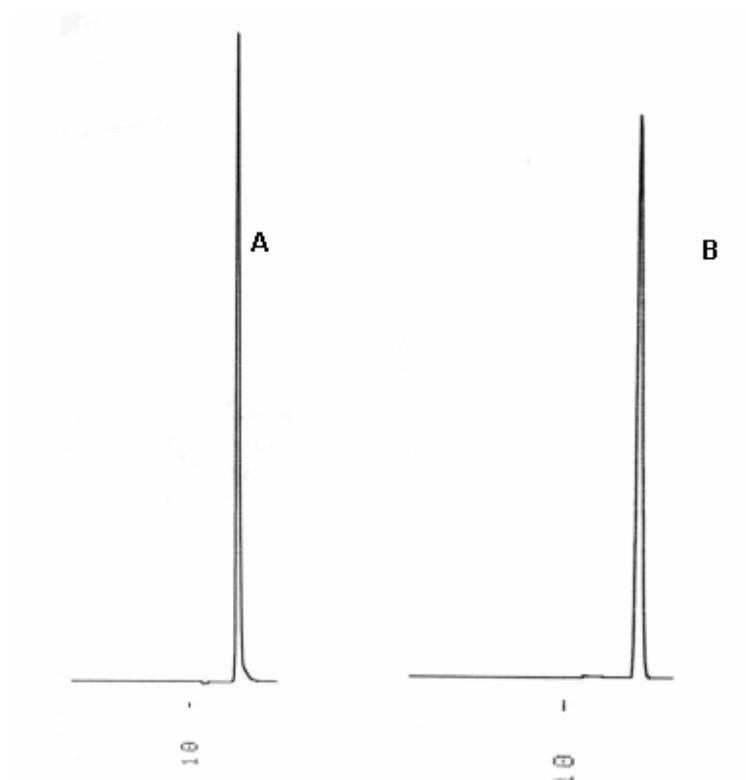
A concentração dos excipientes e solventes empregados na preparação das NC foi estabelecida após testar diferentes proporções de polímero, tensioativos e óleo volátil. Neste sentido, um dos aspectos importantes foi a concentração de óleo volátil utilizada nas nanoestruturas, buscando-se, após incorporar as suspensões em uma base semi-sólida, obter uma concentração final de óleo semelhante às demais formulações desenvolvidas neste trabalho, ou seja, aproximadamente, 5% (m/v). Assim, a concentração de óleo volátil empregada na preparação das NC foi de 6,25%, superior à utilizada em trabalhos realizados por grupo de pesquisa do laboratório (3,3%). Com isso, supõe-se que a quantidade de polímero empregada na preparação das NC (0,4%) não foi suficiente para incorporar a quantidade total de óleo para a formação do núcleo oleoso. Este excesso de óleo pode levar, por hipótese, à emulsificação do mesmo pelos tensioativos na fase aquosa da suspensão, resultando em um sistema contendo, além de NC, gotículas de óleo emulsificadas (nanoemulsão). Esta hipótese foi levantada com base no forte odor de óleo volátil apresentado pela suspensão de NC.

Um outro aspecto se refere à evaporação dos solventes após a preparação das NC. Através da técnica de nanoprecipitação, o solvente orgânico é eliminado por pressão reduzida, e a suspensão coloidal é concentrada, a um volume final estabelecido (FESSI *et al.*, 1989). Nas NC preparadas com o óleo volátil, este processo requereu alguns cuidados especiais, com o objetivo de evitar a perda de quantidades significativas de óleo, ou a sua quase completa eliminação após a evaporação. Assim, foi necessário proceder a eliminação somente do solvente orgânico (acetona), uma vez que o processo de redução do volume de água ocasionou, também, a eliminação, concomitante, do óleo volátil, de forma similar ao que ocorre no processo de extração do óleo volátil das folhas de *C. citratus*, o qual é realizado por arraste de

vapor d'água. Desta forma, a água presente na suspensão de NC não foi eliminada, constituindo parte da fase aquosa da emulsão semi-sólida.

A determinação da concentração de óleo volátil presente nas nanoestruturas constituiu uma das etapas importantes na otimização destes sistemas. Para verificar a concentração de óleo volátil total presente nas suspensões de NC, após a evaporação do solvente orgânico, realizou-se a determinação quantitativa do citral, principal componente do óleo volátil, por CLAE. Sabendo-se o teor de citral presente no óleo volátil (aproximadamente, 76%), por extrapolação, estima-se a quantidade de óleo volátil presente nas NC. O teor médio de citral obtido foi de 88,27% (Tabela 4.5). Através deste resultado verifica-se que o processo de evaporação do solvente orgânico acarretou em uma perda do óleo volátil em torno de 12%. Este valor percentual é satisfatório, principalmente por se tratar de uma substância volátil à temperatura ambiente e a evaporação ocorreu à temperatura de 30 a 35 °C. Assim, partindo-se de uma quantidade de 2,5 g de óleo volátil (aproximadamente, 1,90 g de citral), obteve-se, ao final do processo, 2,2 g de óleo volátil na suspensão aquosa de NC. Os cromatogramas obtidos por CLAE para o citral (SQR) e suspensão de NC encontram-se na Figura 4.1.

As NC de Eudragit S100<sup>®</sup> contendo o óleo volátil apresentaram aspecto leitoso e opaco, com reflexo azulado, e odor característico do óleo volátil.



**FIGURA 4.1** – Cromatogramas obtidos por CLAE para SQR (A) e suspensão de NC contendo o óleo volátil (B). Condições cromatográficas: coluna Spherisorb 5CN<sup>®</sup> (250 mm x 4,6 mm, 5 μm) e pré-coluna Spherisorb 5CN<sup>®</sup> (10 mm x 4,6 mm, 5 μm); fase móvel *n*-hexano:etanol (85:15, v/v); fluxo 0,3 ml/min.; detecção 233 nm (1,0 AUFS); tempo de retenção 13,8 min.

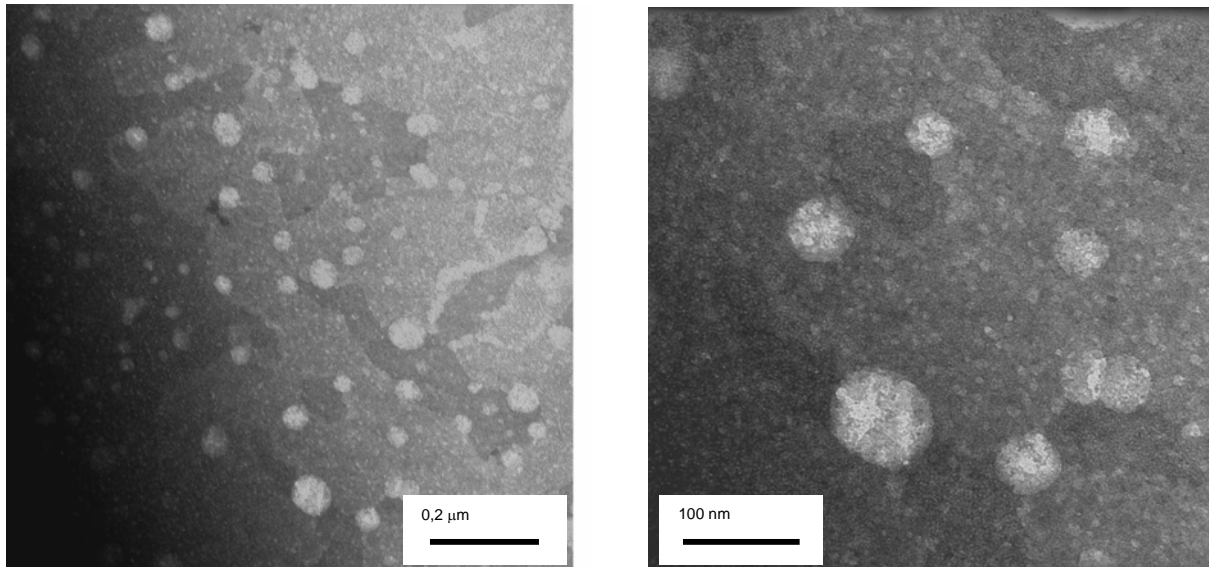
A Tabela 4.5 expressa os valores de pH, diâmetro médio das partículas e teor de citral obtidos para as suspensões de NC contendo o óleo volátil de *C. citratus*.

**TABELA 4.5** – Características das suspensões de NC contendo óleo volátil de *C. citratus* (n = 3).

pH ± s	Diâmetro médio ± s (nm)	Teor de citral (%)
3,66 ± 0,025	258 ± 32,33	88,27 (DPR = 1,47)

As suspensões de NC desenvolvidas neste trabalho apresentaram valores de pH ácido ( $3,66 \pm 0,025$ ) e diâmetros de partícula compatível com o método de preparação utilizado ( $258 \pm 32,33$  nm). Em outros trabalhos, NC de Eudragit S100<sup>®</sup> contendo melatonina apresentaram diâmetro de partícula de  $236 \pm 20$  nm e valores de pH de 3,97 (SCHAFFAZICK *et al.*, 2005), enquanto que BECK e colaboradores (2004) obtiveram NC de Eudragit S100<sup>®</sup> (com Mygliol 810<sup>®</sup>) apresentando diâmetro médio de  $119 \pm 1$  nm e valores de pH de  $3,71 \pm 0,03$ , utilizando o método de nanoprecipitação e os mesmos tensioativos, porém, em diferentes concentrações. Diferenças no tamanho de partícula são esperadas, pois as NC contendo o óleo volátil foram preparadas em diferentes proporções de polímero, tensioativos e solventes, além do núcleo oleoso utilizado nestes sistemas. De acordo com a literatura, parâmetros como a concentração do fármaco, a natureza e a concentração do polímero e dos tensioativos empregados, a natureza do núcleo oleoso, a concentração de óleo na solução orgânica, a velocidade de difusão da fase orgânica na fase aquosa e a proporção de solvente orgânico/água podem influenciar na distribuição e no tamanho das nanopartículas (GUTERRES *et al.*, 1995; LEGRAND *et al.*, 1999).

A avaliação morfológica das NC empregando a microscopia eletrônica de transmissão demonstrou a formação de partículas esféricas, com diâmetros inferiores a 100 nm (Figura 4.2). Cabe ressaltar que as diferenças dos diâmetros observados podem ser atribuídas à diferenças entre as técnicas. Enquanto a técnica de espalhamento de luz determina o raio hidrodinâmico das partículas, incluindo suas camadas de solvatação, a microscopia eletrônica de transmissão determina o diâmetro das partículas após secagem.



**FIGURA 4.2** – Fotomicrografias obtidas a partir de nanocápsulas de Eudragit S100<sup>®</sup> contendo o óleo volátil de *C. citratus* por MET.

Os resultados obtidos na caracterização físico-química das NC contendo óleo volátil de *C. citratus* foram satisfatórios e permitiram a sua utilização na elaboração de uma forma farmacêutica semi-sólida.



## **4.2.3 FORMULAÇÕES SEMI-SÓLIDAS**

### **4.2.3.1 Preparação**

Foram preparados três tipos de bases semi-sólidas para a incorporação do óleo volátil, designadas por: ENI (emulsão não-iônica), GH (gel hidrofílico) e GL (gel lipofílico). Estas formulações foram empregadas como controle nos testes e ensaios realizados. As formulações contendo o óleo volátil foram designadas por ENIO, ENINC<sub>OV</sub>, GHO e GLO (emulsão não-iônica, emulsão não-iônica com suspensão de NC, gel hidrofílico e gel lipofílico, respectivamente).

#### **4.2.3.1.1 Emulsão não-iônica O/A (ENI)**

As emulsões foram preparadas conforme técnica usual de preparação, ou seja, as fases hidrofílica e lipofílica foram aquecidas, separadamente, à temperatura de 70 °C e emulsificadas em gral de porcelana, após fusão dos componentes oleosos e a dissolução dos componentes hidrossolúveis, vertendo-se, lentamente, a fase hidrofílica sobre a fase lipofílica e posterior homogeneização e resfriamento. Para estas formulações, os componentes empregados compreenderam ceras, óleos e tensioativos não-iônicos, em proporções usuais. Após a preparação das bases, o óleo volátil foi incorporado às mesmas, nas proporções de 3 e 5 g de óleo para 100 g de base, com posterior homogeneização.

Além destas, formulações contendo as suspensões de NC com o óleo volátil foram, também, incorporadas à base ENI, sob agitação constante (formulação ENINC<sub>OV</sub>).

As formulações foram preparadas em triplicata e acondicionadas em frascos plásticos, de parede dupla, com tampa rosqueável, mantidos à temperatura

ambiente, para posterior caracterização. Os componentes empregados na preparação de tais formulações encontram-se na Tabelas 4.6.

**TABELA 4.6** – Componentes empregados na preparação das emulsões.

Componentes	ENI (% m/v)	ENIO3 (% m/v)	ENIO5 (% m/v)	ENINC <sub>OV</sub> (g)
Álcool cetílico	4,0	4,0	4,0	2,0
Eumulgin B2 <sup>®</sup>	2,0	2,0	2,0	1,0
MEG	8,0	8,0	8,0	4,0
Cetiol V <sup>®</sup>	5,0	5,0	5,0	2,5
BHT	0,01	0,01	0,01	0,007
Germall 115 <sup>®</sup>	0,1	0,1	0,1	0,07
Propilenoglicol	5,0	5,0	5,0	2,5
Óleo volátil	-	3,0	5,0	-
Suspensão NC contendo óleo volátil	-	-	-	40 ml
Água q.s.p.	100,0 ml	100,0 ml	100,0 ml	30 ml

#### 4.2.3.1.2 Géis: gel hidrofílico (GH) e gel lipofílico (GL)

Dispersões foram preparadas, mediante a dispersão dos polímeros em água e incorporação do óleo volátil, com auxílio de tensoativos não iônicos. Dois tipos de polímeros foram empregados: Carbopol 940<sup>®</sup> (GH) e Lubragel<sup>®</sup> (GL).

Os géis foram preparados em gral de porcelana e, após completa mistura dos componentes, o óleo volátil foi incorporado à formulação, com posterior agitação.

Da mesma forma que para as emulsões, os géis foram preparados em triplicata e acondicionados em frascos plásticos, de parede dupla, com tampa

rosqueável. Os componentes empregados para estas formulações estão listados na Tabela 4.7.

**TABELA 4.7** – Componentes empregados na preparação dos géis.

<b>Componentes</b>	<b>GH (% m/v)</b>	<b>GHO (% m/v)</b>	<b>GL (% m/v)</b>	<b>GLO (% m/v)</b>
Carbopol 940 <sup>®</sup>	1,5	1,5	-	-
Lubragel <sup>®</sup>	-	-	25,0	25,0
Trietanolamina	1,5	1,5	-	-
Tween 80	0,5	0,5	0,5	0,5
Germall 115 <sup>®</sup>	0,1	0,1	0,1	0,1
Sol. Carbopol 940 <sup>®</sup> 1,5%	-	-	2,0	2,0
Óleo volátil	-	5,0	-	5,0
Água q.s.p.	100,0 ml	100,0 ml	100,0 ml	100,0 ml

#### 4.2.3.1.3 Formulações de referência

Com a finalidade de comparar a atividade antifúngica das formulações em estudo com dois antifúngicos padrões, foram, também, preparadas duas formulações: uma contendo cetoconazol (2%, m/m) e outra nistatina (25000 UI/g), designadas ENI<sub>CETO</sub> e ENI<sub>NIST</sub>, respectivamente. As concentrações das substâncias ativas empregadas nestas formulações correspondem às concentrações utilizadas em preparações comerciais. Os fármacos foram incorporados à base ENI.

#### **4.2.3.2 Avaliação das propriedades físico-químicas das formulações**

##### **4.2.3.2.1 Análise macroscópica (SAGON, 1983)**

Foram avaliadas as características visuais das formulações em estudo, no que se refere a cor, odor e aspecto.

##### **4.2.3.2.2 Determinação do pH (SAGON, 1983)**

A medida dos valores de pH das formas farmacêuticas foi realizada em potenciômetro previamente calibrado (Digimed DM-20) com soluções tampão pH 4,0 e 7,0, após a diluição das amostras em água, a uma concentração de 10% (m/v). Os resultados expressam a média de três amostras.

##### **4.2.3.2.3 Teste de centrifugação (SAGON, 1983)**

A avaliação da estabilidade das formulações frente à centrifugação foi realizada empregando-se 5 g das amostras em estudo, centrifugando-as a 3000 rpm, durante 30 minutos.

##### **4.2.3.2.4 Avaliação da viscosidade das formulações (MARRIOT, 2005; SCHOTT, 2000; WOOD, 2001)**

As características reológicas das formulações foram avaliadas com o auxílio dos viscosímetros rotacionais Brookfield (Massachusetts, U.S.A.), modelos DVII+, série LV (para as emulsões e os géis lipofílicos) e DVI+, série RV (para os géis hidrofílicos), utilizando-se *spindle* SC4-25. Um minuto após o ajuste de cada fator de velocidade, foi realizada a leitura dos valores de viscosidade.

Os reogramas foram obtidos pela representação gráfica de viscosidade ( $cP$ ) em função da velocidade de rotação (rpm), e de tensão de cisalhamento ( $D/cm^2$ ) em função da velocidade de cisalhamento ( $s^{-1}$ ).

A viscosidade das formulações em estudo foi determinada à temperatura de  $25\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

#### **4.2.3.3 Avaliação da atividade antifúngica das formulações**

Para a avaliação da atividade antifúngica das formulações semi-sólidas em estudo empregou-se cepas de algumas espécies de fungos causadores de dermatomicoses (dermatófitos) e a levedura de *Candida albicans*.

Os ensaios foram realizados empregando-se meios de cultura e soluções previamente esterilizados em autoclave ( $121\text{ }^{\circ}\text{C}$ , durante 15 minutos) e a vidraria em estufa ( $200\text{ }^{\circ}\text{C}$ , durante uma hora).

##### **4.2.3.3.1 Atividade antifúngica frente à *Candida albicans* (RAUBER, 2001)**

O ensaio foi realizado pelo método microbiológico de difusão em ágar com pocinhos, frente à levedura de *Candida albicans* ATCC 10231, desenvolvida em ágar Sabouraud dextrose 4% (tubo inclinado), a  $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ , por 48 horas. O inóculo utilizado foi a 1% (v/v), após o preparo da suspensão do microrganismo em solução salina estéril (0,9%), a uma concentração de  $25\% \pm 2\%$  de transmitância, lida em fotolorímetro, a 580 nm.

O padrão utilizado foi a nistatina, na concentração de 0,3 mg/ml.

As formulações empregadas neste ensaio compreenderam: emulsões e géis contendo o óleo volátil (ENIO3, ENIO5, ENINC<sub>OV</sub>, GHO e GLO), formulações

controle, sem o óleo volátil (ENI, GH e GHO) e a formulação contendo nistatina (ENI<sub>NIST</sub>). A quantidade de amostra testada, para cada formulação, foi de 0,2 g.

Utilizaram-se grupos de seis placas de Petri para cada amostra analisada, as quais continham 20 ml de meio Sabouraud dextrose 4% como camada base e 5 ml de inóculo.

Após solidificação do meio nas placas, orifícios de 9,34 mm de diâmetro foram feitos, para posterior adição das amostras e solução padrão (100 µl). Após, as placas foram incubadas à temperatura de 35 °C ± 2 °C, por 24 horas, e, a seguir, realizou-se a leitura do diâmetro dos halos de inibição, com o auxílio de paquímetro digital.

#### **4.2.3.3.2 Atividade antifúngica frente a dermatófitos** (LIMA *et al.*, 1992; LIMA *et al.*, 1993; WANNISSORN *et al.*, 1996)

A atividade antifúngica das formulações frente aos dermatófitos foi realizada pelo método microbiológico de difusão em ágar com pocinhos. Os fungos empregados neste experimento foram obtidos junto ao acervo de Coleção de Culturas Micoteca – Departamento de Micologia da Universidade Federal de Pernambuco: *Microsporum canis* 4158 URM (isolado de escamas epidérmicas das costas) e *Trichophyton rubrum* 4194 URM (isolado de escamas epidérmicas da região inguino-crural).

Os microrganismos foram cultivados em ágar Sabouraud dextrose 4% (tubo inclinado), à temperatura de 28-30 °C, por um período de 7 a 10 dias. Após, fragmentos de micélios e microconídios foram coletados e suspensos em solução salina estéril (0,9%, com 0,1% de Tween 80). A suspensão foi filtrada com o auxílio de gaze estéril para remover os agregados e após, a densidade da mesma foi padronizada em fotocolorímetro, a uma concentração de 78% ± 2% de transmitância, a 580 nm. Os inóculos foram empregados nas concentrações de 2% (v/v).

Como padrões (controles positivos) utilizou-se solução de nistatina, na concentração de 0,3 mg/ml, e a formulação ENI<sub>CETO</sub>, contendo cetoconazol, na concentração de 2%.

As quantidades de amostra testadas foram 0,2 g para as formulações semi-sólidas e 100 µl para a solução padrão, colocando-se, individualmente, em cada orifício, conforme descrito no item 4.2.3.3.1. Foram utilizados grupos de seis placas de Petri para cada quantidade de amostra empregada.

Após a distribuição do meio nas placas (20 ml de ágar Sabouraud dextrose 4% como camada base e 5 ml de inóculo) e das amostras, as mesmas foram incubadas à temperatura de 28 °C ± 2 °C, por 4 dias e, após este período, foi realizada a leitura do diâmetro dos halos de inibição, com o auxílio de paquímetro digital.

#### **4.2.3.4 Resultados e discussão**

##### **4.2.3.4.1 Determinações físico-químicas**

A Tabela 4.8 expressa os resultados obtidos na avaliação das características organolépticas e na determinação do pH para as formulações semi-sólidas contendo o óleo volátil de *C. citratus*. Estas determinações foram realizadas 48 horas após a preparação das mesmas.

**TABELA 4.8** – Características organolépticas e valores de pH das formulações semi-sólidas em estudo (n = 3).

<b>Formulações</b>	<b>Cor</b>	<b>Odor</b>	<b>pH ± s</b>	<b>DPR</b>
ENI	branca	inodoro	6,63 ± 0,02	0,30
ENIO3	branca	forte e característico	6,23 ± 0,07	1,12
ENIO5	branca	forte e característico	6,43 ± 0,02	0,31
ENINC <sub>OV</sub>	branca	forte e característico	6,09 ± 0,04	0,66
GH	incolor	inodoro	7,25 ± 0,03	0,41
GHO	branca	forte e característico	7,10 ± 0,02	0,28
GL	incolor	inodoro	6,13 ± 0,03	0,49
GLO	esbranquiçada	forte e característico	5,88 ± 0,03	0,51

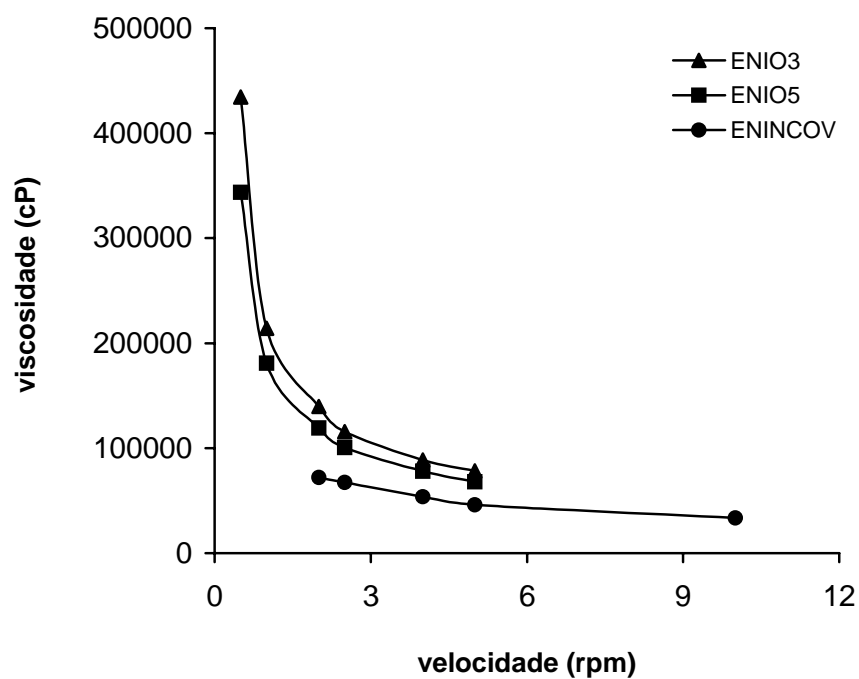
As formulações apresentaram-se homogêneas em relação à cor, odor e aspecto, mantendo as características específicas de cada tipo de base semi-sólida empregada. Em função da presença do óleo volátil, as formulações ENIO3, ENIO5, ENINC<sub>OV</sub>, GHO e GLO apresentaram odor forte e característico do mesmo.

Os valores de pH obtidos encontraram-se na faixa de 5,88 a 7,10, compatíveis com a aplicação destes produtos na pele (GENNARO, 2000). Observa-se que a incorporação do óleo volátil às bases acarretou em uma pequena diminuição do pH, e pode estar relacionada ao pH do óleo volátil, que corresponde a 4,5. Além disso, comparando-se os valores de pH das emulsões, verifica-se que a emulsão ENINC<sub>OV</sub> apresentou menores valores, em virtude do baixo pH da suspensão de NC (3,66).

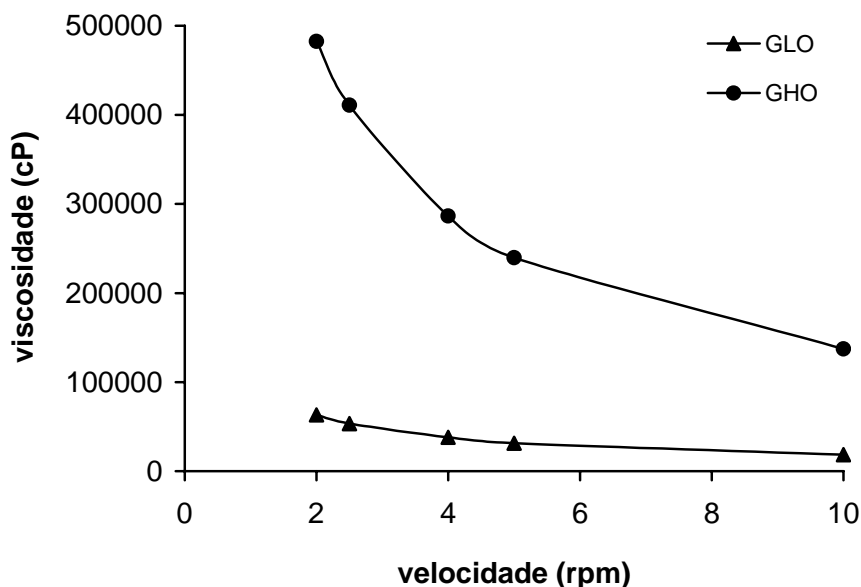
No teste de centrifugação não foi observada separação de fases, após centrifugar as formulações a 3000 rpm, durante 30 minutos.



A avaliação da consistência das preparações semi-sólidas foi avaliada através da viscosidade. Os resultados obtidos estão expressos nas Figuras 4.3 e 4.4 e nos Anexos 10.1, 10.2, 10.3, 10.4, 10.5, 10.6, 10.7, 10.8, 10.9 e 10.10.



**FIGURA 4.3** – Representação gráfica da viscosidade em função da velocidade, para as formulações ENIO3, ENIO5 e ENINCOV.



**FIGURA 4.4** – Representação gráfica da viscosidade em função da velocidade, para as formulações GHO e GLO.

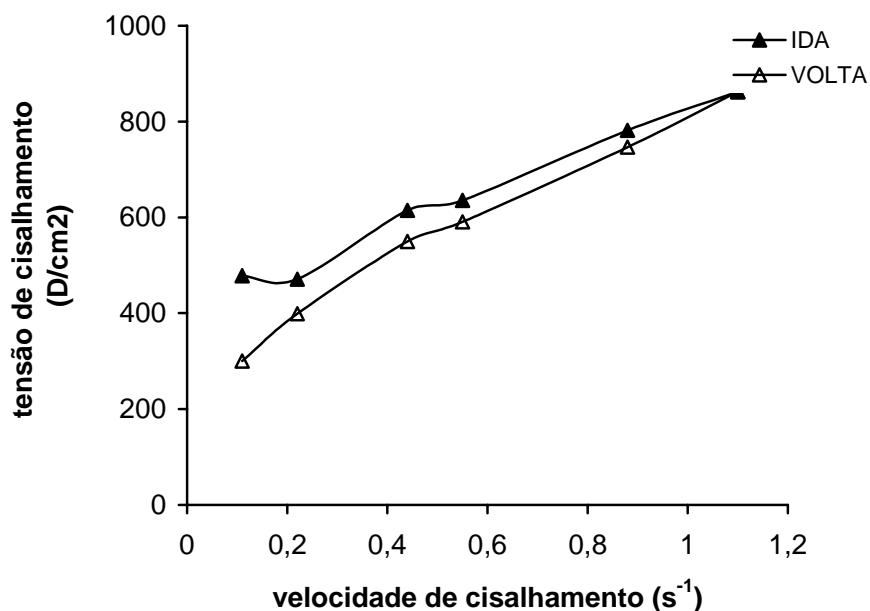
Através dos resultados obtidos na avaliação da viscosidade das formulações semi-sólidas contendo o óleo volátil de *C. citratus* verifica-se que as preparações apresentaram comportamento de fluxo não-newtoniano, uma vez que seus valores de viscosidade alteraram com o aumento da velocidade de cisalhamento (SCHOTT, 2000; WOOD, 2001). As emulsões (ENIO3, ENIO5 e ENINC<sub>OV</sub>) apresentaram valores de viscosidade inferiores ao gel hidrofílico (GHO), porém, mais viscosas que o gel lipofílico (GLO).

Comparando-se os géis, a formulação contendo o gel hidrofílico (GHO) apresentou maior viscosidade que o gel lipofílico (GLO). Diferenças nos valores de viscosidade foram, também, observadas para as emulsões. A formulação ENIO3 apresentou maior viscosidade que a formulação ENIO5, e estas, maior viscosidade que ENINC<sub>OV</sub>. Desta forma, verifica-se que uma maior viscosidade foi obtida com uma menor quantidade de óleo volátil incorporado à base não-iônica. Além disso, a menor viscosidade apresentada pela formulação ENINC<sub>OV</sub> se relaciona a menor concentração dos excipientes empregados na sua preparação, bem como a maior quantidade de

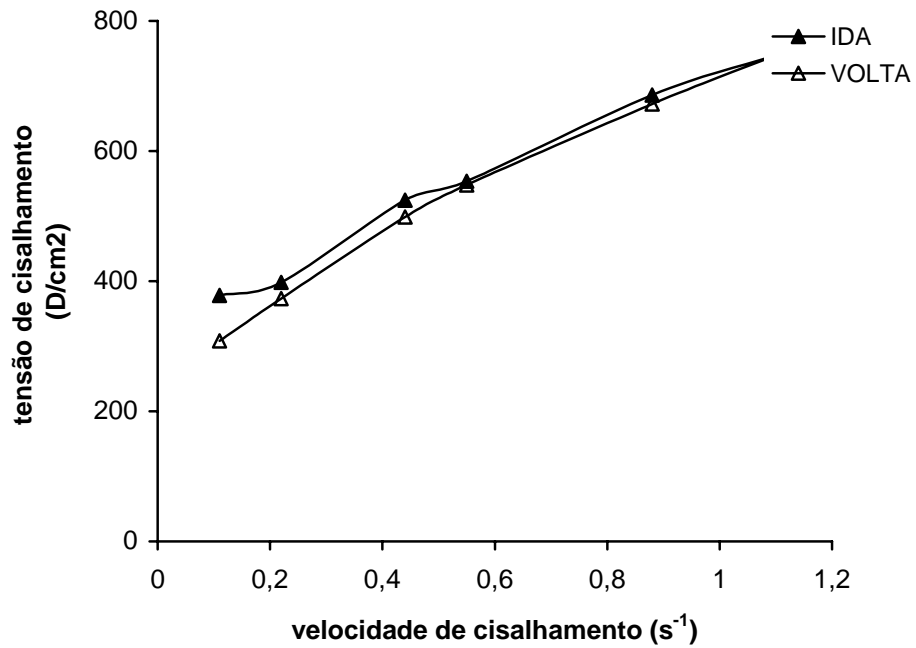
água presente (percentual de água de 73%, 71% e 82,1% para as formulações ENIO3, ENIO5 e ENINC<sub>OV</sub>, respectivamente), obtendo-se um produto com menor viscosidade, em comparação com as demais formulações.

Além disso, através da representação gráfica da tensão de cisalhamento em função da velocidade de cisalhamento, foi possível verificar o comportamento de fluxo apresentado para as formulações semi-sólidas em estudo (Figuras 4.5, 4.6, 4.7, 4.8 e 4.9).

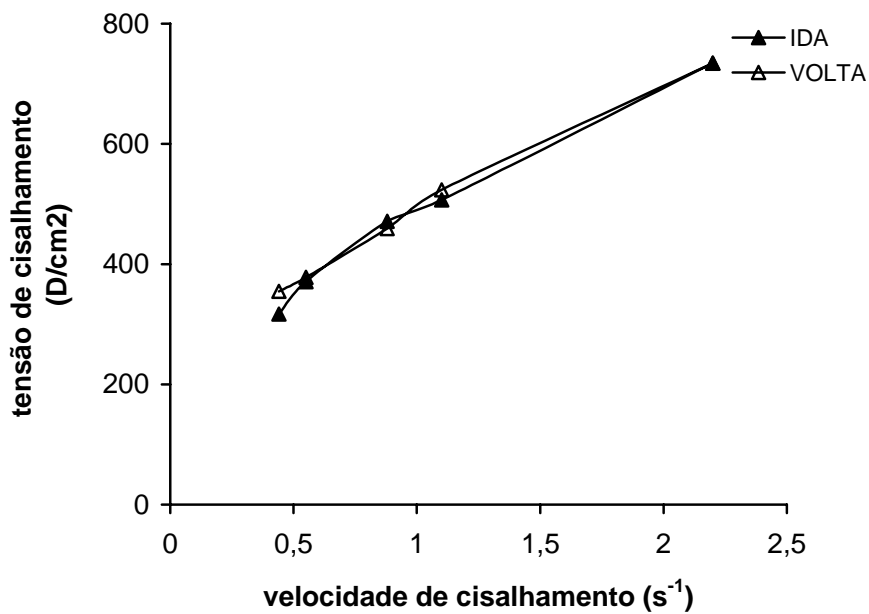
De acordo com o tipo de escoamento apresentado quando submetidas a uma determinada força externa, as emulsões (ENIO3, ENIO5 e ENINC<sub>OV</sub>) e os géis (GHO e GLO) podem ser classificados como sistemas não-newtonianos plásticos e pseudoplásticos, respectivamente, uma vez que a viscosidade diminui com o aumento da velocidade de cisalhamento (MARRIOT, 2005; SCHOTT, 2000; WOOD, 2001).



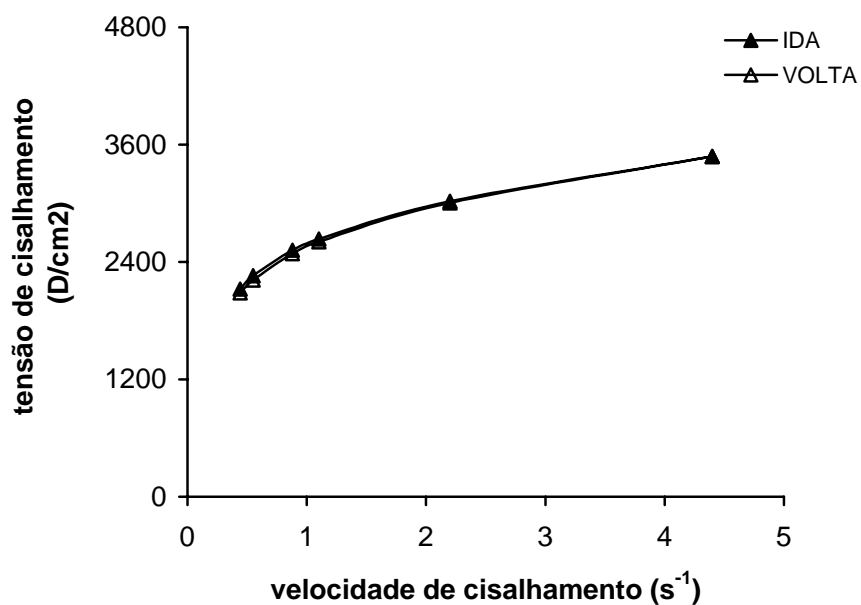
**FIGURA 4.5** – Representação gráfica da tensão de cisalhamento em função da velocidade de cisalhamento para a formulação ENIO3.



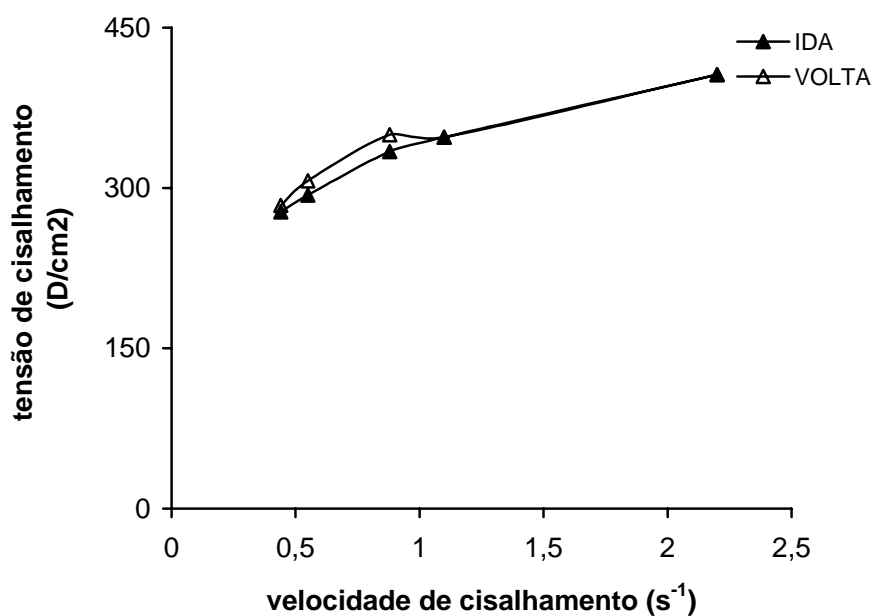
**FIGURA 4.6** – Representação gráfica da tensão de cisalhamento em função da velocidade de cisalhamento para a formulação ENIO5.



**FIGURA 4.7** – Representação gráfica da tensão de cisalhamento em função da velocidade de cisalhamento para a formulação ENINC<sub>OV</sub>.



**FIGURA 4.8** – Representação gráfica da tensão de cisalhamento em função da velocidade de cisalhamento para a formulação GHO.



**FIGURA 4.9** – Representação gráfica da tensão de cisalhamento em função da velocidade de cisalhamento para a formulação GLO.

Os sistemas plásticos são caracterizados por apresentar um valor de cedência, ou seja, começam a fluir a partir de um determinado valor de tensão de cisalhamento e, a tensões menores, comportam-se como materiais sólidos. Este tipo de fluxo é verificado para suspensões concentradas e algumas preparações semi-sólidas, como emulsões. Soluções poliméricas e sistemas semi-sólidos que contenham componentes poliméricos, em consequência da existência de interações intermoleculares entre as cadeias dos polímeros, exibem comportamento de fluxo pseudoplástico, caracterizados por não apresentar ponto de cedência e começam a fluir tão logo lhes é aplicada uma tensão de cisalhamento. A viscosidade diminui gradualmente com o aumento da tensão de cisalhamento (MARRIOT, 2005; SCHOTT, 2000; WOOD, 2001).

Uma outra característica importante relacionada a estes sistemas é a tixotropia. Submetendo as formulações semi-sólidas em estudos à velocidades gradualmente crescentes e decrescentes de cisalhamento, verifica-se para as formulações ENIO3 e ENIO5 um deslocamento da curva descendente em relação à curva ascendente, apresentando um *loop* de histerese (Figuras 4.5 e 4.6). A área dentro do *loop* indica o grau de tixotropia das substâncias ou formulações (MARRIOT, 2005). Assim, verifica-se que a formulação ENIO3 apresenta maior grau de tixotropia em comparação com a formulação ENIO5.

RAUBER (2001) avaliou as propriedades físico-químicas e microbiológicas de formulações semi-sólidas contendo o óleo volátil na concentração de 10%. Através dos resultados, foi possível selecionar a emulsão não-iônica e o gel hidrofílico para dar continuidade aos ensaios propostos no presente trabalho, com algumas modificações em sua composição. Inicialmente, a concentração de óleo volátil utilizada na preparação das formulações foi determinada em 10%; entretanto, ensaios preliminares de irritação dérmica demonstraram um acentuado efeito irritante provocado pela emulsão e pelo gel nos ensaios *in vivo*. Além disso, em virtude do pH ácido apresentado pela emulsão não-iônica (formulação ENI-O, pH 4,17), decorrente do emprego de ácido sórbico como conservante, optou-se, então, pela utilização de

imidazolidiniluréia, mantendo-se os demais componentes e suas respectivas concentrações na nova base não-iônica desenvolvida. Ainda, um outro polímero foi empregado na preparação do gel lipofílico (poliacrilato de glicerila). Em relação ao comportamento de fluxo apresentado para a emulsão não-iônica e o gel hidrofílico não foram observadas diferenças.

#### 4.2.3.4.2 Avaliação da atividade antifúngica

Os resultados obtidos na avaliação da atividade antifúngica das formulações contendo o óleo volátil de *C. citratus* frente à levedura de *C. albicans* e fungos dermatófitos (*M. canis* e *T. rubrum*) encontram-se na Tabela 4.9.

**TABELA 4.9** – Diâmetros dos halos de inibição obtidos para as formulações, através do ensaio microbiológico de difusão em ágar – pocinhos.

Formulações (0,20g)	Diâmetro dos halos de inibição (mm)*		
	<i>C. albicans</i>	<i>M. canis</i>	<i>T. rubrum</i>
ENIO3	< 10	IT	IT
ENIO5	12-14	IT	IT
ENINC <sub>OV</sub>	< 10	-	-
ENI <sub>NIST</sub>	22-23	-	-
ENI <sub>CETO</sub>	-	37-39	51-54
GHO	28-30	IT	IT
GLO	34-37	IT	IT
Solução nistatina (100 µl)	22-23	9-10	12-15

\*: seis determinações; IT = inibição total; - = não testado

As formulações ENIO5, GHO e GLO apresentaram atividade antifúngica *in vitro* frente à *C. albicans*, destacando-se os géis, obtendo-se halos de inibição superiores a 28 e 34 mm para os géis hidrofílico e lipofílico, respectivamente. As formulações ENIO3 e ENINC<sub>OV</sub> apresentaram halos de inibição muito pequenos

(aproximadamente, 10 mm), sendo desconsiderados. As formulações controle (sem o óleo volátil – ENI, GH e GL) não apresentaram atividade.

Comparando-se os halos de inibição obtidos para as formulações contendo o óleo volátil com a formulação contendo nistatina (ENI<sub>NIST</sub>) frente à *C. albicans* verifica-se que as formulações GHO e GLO apresentaram maiores halos de inibição, ao contrário das emulsões, empregando-se 0,2 g de cada amostra.

De posse dos resultados obtidos verifica-se que a base empregada para a incorporação do óleo volátil influenciou na sua atividade antifúngica *in vitro*, de acordo com a metodologia utilizada. A menor atividade apresentada para as emulsões frente à levedura, verificada pelo halo de inibição formado, pode estar relacionada ao fato de que, nestas preparações, o óleo encontra-se na fase interna das mesmas, dificultando, desta forma, a sua liberação.

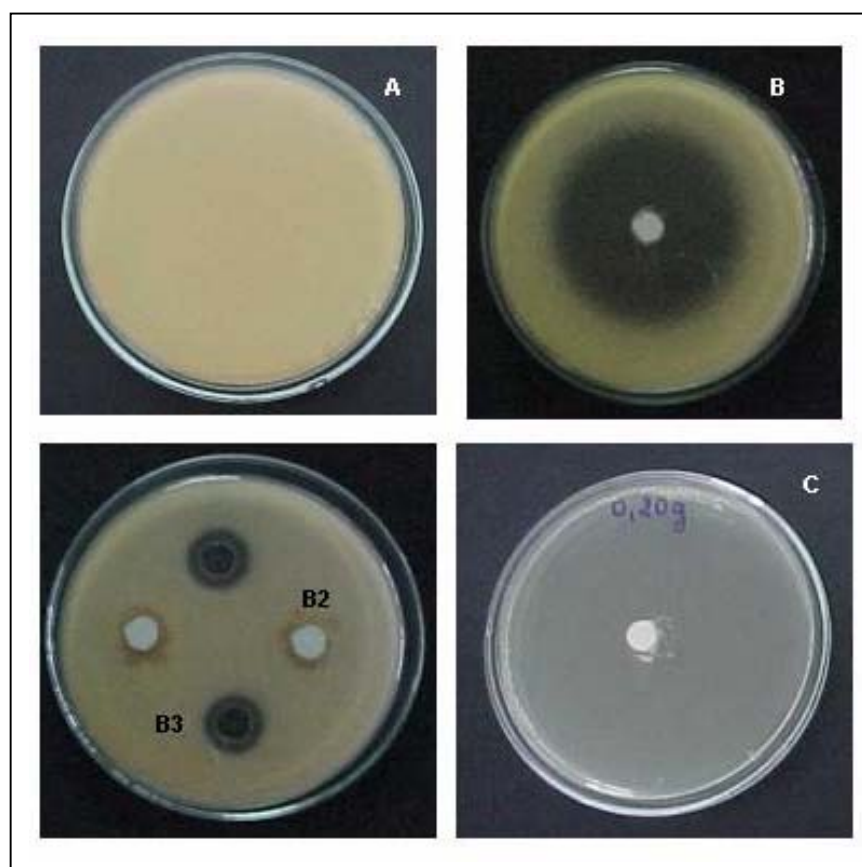
Resultados semelhantes foram obtidos por OYEDELE e colaboradores (2002), os quais avaliaram a atividade inseticida de cremes e pomadas contendo o óleo volátil de *C. citratus*. A ação repelente da pomada hidrofílica (base Macrogol 4000<sup>®</sup> e Macrogol 600<sup>®</sup>) foi maior quando comparada com o creme (base monoestearato de glicerila) e a pomada oleosa (base vaselina), tendo sido atribuído uma maior liberação dos vapores do óleo na base hidrofílica. Além disso, a menor liberação do óleo na base oleosa pode ser relacionada à afinidade lipofílica do óleo e os constituintes da mesma, bem como a sua viscosidade.

A diminuição da atividade antimicrobiana de óleos voláteis em um meio aquoso tem sido relatada, principalmente, em presença de tensioativos e outros compostos lipofílicos. Este menor efeito se deve ao fato de que as moléculas lipofílicas no meio aquoso tendem a associar-se e formar micelas, dificultando, desta forma, a ação dos componentes ativos do óleo sobre o microrganismo (INOUE, 2003).

Na avaliação da atividade antifúngica frente aos fungos dermatófitos (*M. canis* e *T. rubrum*) verificou-se que as formulações semi-sólidas contendo o óleo volátil inibiram completamente o crescimento dos fungos, empregando-se 0,20 g de cada



preparação (Tabela 4.9). O diâmetro dos halos de inibição foram medidos 4 dias após a realização do teste; entretanto, para promover o maior crescimento dos fungos, realizou-se, também, a leitura depois de 7 dias de incubação. Após este período, verificou-se que as placas contendo as amostras controle (ENI, GH, GL, ENI<sub>CETO</sub> e solução de nistatina) apresentaram contaminação microbiana; ao contrário, as placas contendo as formulações com o óleo volátil (ENIO3, ENIO5, GHO e GLO) continuaram a não apresentar crescimento microbiano, tão pouco contaminação por outro microrganismo. Estas observações demonstram a importante atividade antimicrobiana apresentada pelo óleo volátil, em especial frente aos fungos dermatófitos, e um maior efeito inibitório quando comparado com antifúngico padrão (cetoconazol), usualmente empregado no tratamento de algumas dermatomicoses. A Figura 4.10 ilustra os resultados obtidos nestes ensaios.



**FIGURA 4.10** – Atividade antifúngica frente ao *M. canis*. (A) crescimento do fungo; (B) formulação ENI<sub>CETO</sub>; (B2) base ENI; (B3) solução de nistatina; (C) formulação contendo o óleo volátil - ENIO5.

Estes resultados são coerentes com a literatura que demonstra, em algumas pesquisas, o efeito inibitório do óleo volátil frente a algumas espécies de fungos dermatófitos e seu potencial emprego no tratamento de infecções fúngicas (KISHORE *et al.*, 1993; LIMA *et al.*, 1992; WANNISSORN *et al.*, 1996). O óleo volátil inibiu completamente o crescimento das espécies *T. rubrum* e *M. gypseum* em baixas concentrações (1000 e 2000 ppm) (KISHORE *et al.*, 1993), apresentando efeito fungicida (KISHORE *et al.*, 1993; WANNISSORN *et al.*, 1996).

Comparando-se a atividade antifúngica das formulações frente à levedura de *C. albicans* e os fungos dermatófitos verificou-se um maior efeito para os fungos filamentosos (*M. canis* e *T. rubrum*). Resultados semelhantes foram obtidos por INOUE (2003) na avaliação da atividade antimicrobiana de óleos voláteis, dentre eles, *C. citratus* frente a fungos e bactérias. A membrana celular é o principal local de ação dos óleos voláteis e a alta suscetibilidade dos fungos filamentosos, comparados com as bactérias e leveduras, pode estar relacionada à natureza aeróbica do fungo filamentoso, uma vez que os óleos lipofílicos podem ser facilmente absorvidos e difundidos através da membrana fúngica. Além disso, a maior resistência apresentada pelas bactérias Gram-negativas, por exemplo, é decorrente da estrutura celular destes microrganismos, os quais são protegidos por uma membrana hidrofílica externa que dificulta a passagem de componentes lipofílicos, como os óleos voláteis.

Finalmente, a utilização de testes físico-químicos e microbiológicos na avaliação da qualidade de preparações farmacêuticas semi-sólidas, especialmente, na fase de desenvolvimento de formulações, objetiva definir as características específicas de cada produto, buscando a otimização de formas farmacêuticas adequadas a sua aplicabilidade. Dentre os ensaios empregados, a viscosidade é um importante teste para avaliar a consistência e a estabilidade física das preparações, de modo a obter um produto com viscosidade adequada, de acordo com seu local de aplicação e uso a que se destina, e de fácil aceitação pelo usuário. Neste sentido, as formulações semi-sólidas estudadas apresentaram características adequadas para a aplicação destes produtos na pele, exceto a formulação GLO, pois apresentou baixa viscosidade,

tornando-se insatisfatória para o uso pretendido. Ainda, nos ensaios *in vitro* de atividade antifúngica realizados, observou-se que as formulações desenvolvidas apresentaram efeito inibitório frente às espécies de fungos analisadas, especialmente, para os fungos dermatófitos.

#### **4.2.4 DETERMINAÇÃO QUANTITATIVA (RAUBER *et al.*, 2005)**

Com o objetivo de estabelecer um método analítico para a quantificação de citral no óleo volátil e nas formulações em estudo (suspensões de NC e formulações semi-sólidas) empregou-se a CLAE.

Em virtude da solubilidade do óleo e das condições experimentais utilizadas neste método (solventes e fase estacionária), as formulações empregadas para a avaliação quantitativa compreenderam as emulsões não-iônicas (ENIO3, ENIO5 e ENINC<sub>OV</sub>).

##### **4.2.4.1 Absorção na região do ultravioleta**

Inicialmente, realizou-se uma análise do citral (SQR) e do óleo volátil por espectroscopia de absorção molecular no ultravioleta (UV), com o objetivo de verificar o espectro de absorção do citral e definir o comprimento de onda a ser utilizado na análise cromatográfica. Foram traçados espectros de absorção na região de 200 a 400 nm, utilizando *n*-hexano como solvente. As análises foram realizadas em espectrofotômetro UV/VIS Shimadzu UV 16A (Tóquio, Japão), empregando cubetas de quartzo e *n*-hexano como branco. As soluções foram preparadas na concentração teórica de 20 µg/ml.

##### **4.2.4.2 Condições experimentais**

As análises foram realizadas empregando-se o cromatógrafo a líquido Shimadzu LC-10A (Tóquio, Japão), equipado com bomba modelo LC-10AS, detector com comprimento de onda variável modelo SPD-10A, controlador SCL-10A, integrador C-R6A e injetor Rheodyne com loop de 20 µl.

Para a diluição das amostras e preparação da fase móvel empregou-se *n*-hexano e etanol, ambos com grau cromatográfico. As soluções das amostras e da substância de referência foram filtradas previamente em membrana de nylon MFS (13 mm e 0,45 µm de diâmetro de poro), e injetadas no volume de 20 µl. A fase móvel, após preparação, foi desaerada em ultrassom (UNIQUE – Ultrasonic Cleaner USC 2850, São Paulo) e filtrada em membrana de nylon MFS (47 mm e 0,45 µm de diâmetro de poro). As condições experimentais empregadas encontram-se descritas na Tabela 4.10.

**TABELA 4.10** – Parâmetros utilizados na execução do método por CLAE.

<b>Característica</b>	<b>Descrição</b>
Coluna	Spherisorb 5CN <sup>®</sup> (250 mm x 4,6 mm, 5 µm)
Pré-coluna	Spherisorb 5CN <sup>®</sup> (10 mm x 4,6 mm, 5 µm)
Fase móvel	<i>n</i> -hexano:etanol (85:15, v/v)
Fluxo	0,3 ml/min
Velocidade de registro	2,5 cm/min
Atenuação	64
Sensibilidade de detecção	1,0 AUFS
Comprimento de onda	233 nm
Volume injetado	20 µl
Temperatura de análise	25 °C ± 2 °C

#### 4.2.4.3 Preparação da curva padrão

A partir de uma solução da SQR (cital) com concentração de 125 µg/ml, foram transferidas alíquotas de 2,0; 3,0; 4,0; 5,0 e 6,0 ml para balões volumétricos de 25 ml. Os volumes foram completados com *n*-hexano, obtendo-se soluções com concentrações de 10,0; 15,0; 20,0; 25,0 e 30,0 µg/ml. Foram construídas três curvas padrão e cada solução foi preparada em triplicata.

#### **4.2.4.4 Preparação das amostras**

##### **4.2.4.4.1 Óleo volátil**

Pesou-se 25,0 mg de óleo volátil em balão volumétrico de 200 ml, diluindo-se a amostra com *n*-hexano. A partir desta solução, transferiram-se alíquotas de 4,0 ml para balões volumétricos de 25 ml e completou-se o volume com *n*-hexano, a fim de obter soluções com concentração teórica de 20,0 µg/ml.

##### **4.2.4.4.1.1 Teste de recuperação**

Para o teste pesou-se 25,0 mg de óleo volátil em balão volumétrico de 100 ml e completou-se o volume com *n*-hexano. Após, alíquotas de 2,0 ml dessa solução (aproximadamente, 187,5 µg/ml, 75% de citral) foram transferidas para balões volumétricos de 25 ml contendo 1,0; 2,0 e 2,5 ml da solução da SQR contendo 125 µg/ml de citral (125,0 µg, 250,0 µg e 312,5 µg, respectivamente), e completou-se o volume com *n*-hexano, obtendo-se concentrações finais de 20,0; 25,0 e 27,5 µg/ml. Todas as soluções foram preparadas em triplicata.

##### **4.2.4.4.2 Emulsões**

Para a quantificação de citral nas emulsões, foram preparados 25 g das formulações ENIO3, ENIO5 e ENINC<sub>OV</sub>, em triplicata. Para cada formulação, misturou-se o conteúdo das três embalagens e pesou-se, em béquer de 50 ml, o equivalente a 25,0 mg de citral. Adicionou-se, aproximadamente, 25 ml de etanol e deixou-se sob agitação mecânica por 20 minutos. Transferiu-se o conteúdo para balão volumétrico de 100 ml, com auxílio de *n*-hexano, e completou-se o volume com o mesmo solvente. A partir desta solução, transferiram-se 2,0 ml para balões volumétricos de 25 ml e completou-se o volume com *n*-hexano, obtendo-se soluções com concentração teórica de 20,0 µg/ml.

#### 4.2.4.4.2.1 Teste de recuperação

Para o teste transferiram-se alíquotas de 3,0 ml de soluções amostra (ENIO5 e ENINC<sub>OV</sub>) contendo 125 µg/ml de citral, para balões volumétricos de 25 ml, onde acrescentaram-se, respectivamente, 1,0; 2,0 e 2,5 ml da SQR contendo 125 µg/ml de citral, e completou-se o volume com *n*-hexano. Obteve-se concentrações de 20,0; 25,0 e 27,5 µg/ml. Cada solução foi preparada em triplicata.

#### 4.2.4.5 Cálculos

As médias das áreas absolutas dos picos, correspondentes a cada diluição da substância de referência, foram plotados em gráfico de área absoluta *versus* concentração.

A equação da reta da curva padrão foi determinada através do estudo de regressão linear, pelo método dos mínimos quadrados, e validados pela análise de variância (ANOVA).

A concentração de citral nas amostras foi obtida através da seguinte expressão:

$$C = (A_A \cdot C_{SR})/A_{SR}$$

Onde:

C = concentração de citral nas amostras

A<sub>A</sub> = área absoluta da amostra

A<sub>SR</sub> = área absoluta da substância de referência

C<sub>SR</sub> = concentração da substância de referência

O valor percentual de citral nas amostras (C%) foi calculado pela expressão:

$$C\% = (C_A \cdot 100)/C_T$$

Onde:

$C_A$  = concentração encontrada na amostra

$C_T$  = concentração teórica de citral

Na avaliação da exatidão, as percentagens de recuperação (R%) foram calculadas pela expressão:

$$R\% = [(C_A - C_{NA})/C_R] \cdot 100$$

Onde:

$C_A$  = concentração de citral encontrada na amostra adicionada de substância de referência

$C_{NA}$  = concentração de citral encontrada na amostra não adicionada de substância de referência

$C_R$  = concentração de substância de referência adicionada à amostra

Os limites de detecção (LD) e quantificação (LQ) foram calculados baseados no desvio padrão ( $\sigma$ ) e na inclinação (S) da curva padrão média, segundo as equações (ICH, 1996a):

$$LD = 3,3 \sigma/S$$

$$LQ = 10 \sigma/S$$



#### 4.2.4.6 Validação

Para assegurar a credibilidade do método empregado, o mesmo foi validado, de acordo com os critérios estabelecidos para a validação de procedimentos analíticos, no que se refere a: linearidade, exatidão, precisão, especificidade, limite de detecção e limite de quantificação (BRASIL, 2003b; ICH, 1996a; USP 28, 2005).

- Linearidade: cinco níveis de concentração foram avaliados. As curvas padrão foram obtidas em diferentes dias, determinando-se a inclinação (b), a intersecção (a) e o coeficiente de correlação (r);
- Precisão: foi avaliada através do desvio padrão relativo obtido na determinação de citral no óleo volátil e nas formulações semi-sólidas, analisadas na mesma concentração, no mesmo dia (repetibilidade - oito determinações) e em três dias consecutivos (precisão intermediária – seis determinações), sob as mesmas condições experimentais;
- Limite de detecção: foi considerada a menor quantidade de citral na amostra que pode ser detectada sob as condições experimentais empregadas;
- Limite de quantificação: foi considerada a menor quantidade de citral na amostra que pode ser quantificada, com precisão e exatidão aceitáveis;
- Exatidão: foi avaliada através do teste de recuperação de uma quantidade conhecida de substância de referência adicionada à amostra.

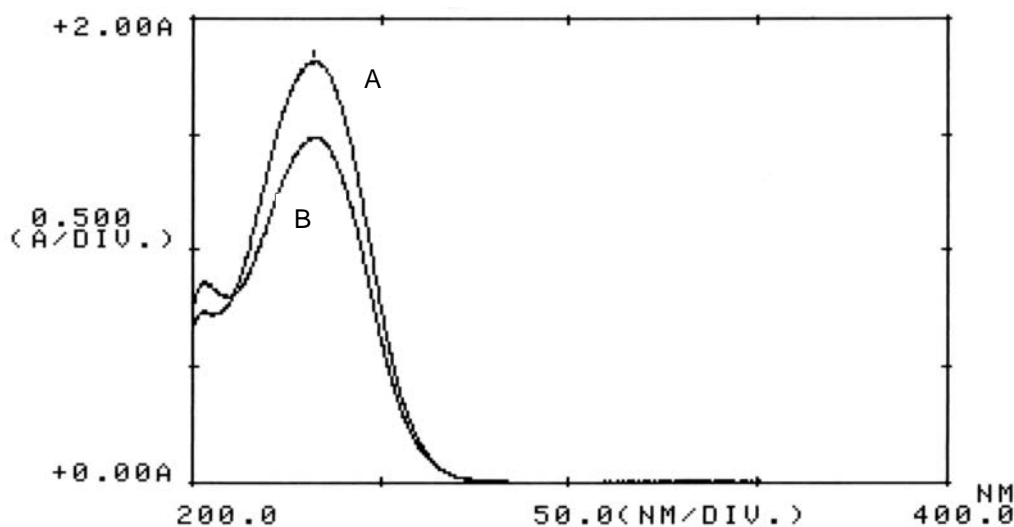
A especificidade do método analítico utilizado na quantificação de citral no óleo volátil e nas formulações em estudo foi avaliada através de dois procedimentos:

- 1) Avaliação de uma solução contendo geraniol, na concentração de 2 µg/ml, em *n*-hexano. O geraniol está presente no óleo volátil na concentração de, aproximadamente, 5%.

- 2) Avaliação dos excipientes: para analisar a especificidade do método para as formulações semi-sólidas utilizou-se as formulações ENI e ENINC, as quais contêm os excipientes empregados na preparação das formulações contendo o óleo volátil. As soluções foram preparadas conforme descrito no item 4.2.4.4.2 e injetadas no cromatógrafo.

#### 4.2.4.7 Resultados

A Figura 4.11 apresenta os espectros de absorção de citral (SQR e óleo volátil) na região do UV, verificando-se o máximo de absorção em 233 nm.



**FIGURA 4.11** – Espectros de absorção no ultravioleta do citral em *n*-hexano, utilizando espectrofotômetro UV/VIS Shimadzu UV 16A. (A) SQR; (B) óleo volátil.

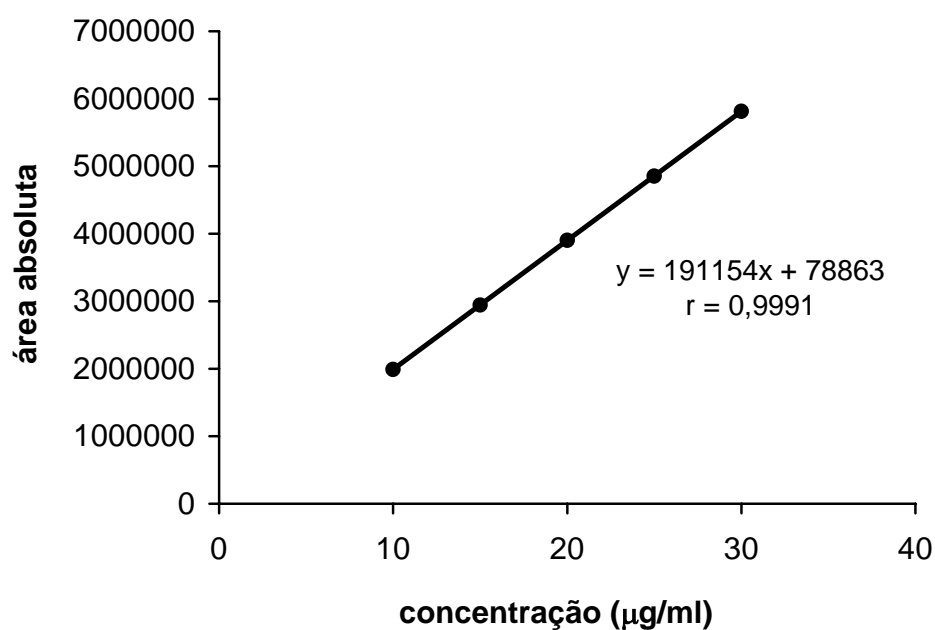
A Tabela 4.11 apresenta as áreas absolutas correspondentes ao citral, relativas a cada uma das diluições da SQR.

**TABELA 4.11** – Valores experimentais obtidos na determinação da curva padrão de citral, por CLAE.

Concentração (µg/ml)	Áreas absolutas*			Média ± e.p.m.	DPR
10,0	1942338	1998780	2029018	1990045 ± 25431	2,21
15,0	2927261	2951798	2957949	2945669 ± 9385	0,55
20,0	3827940	3897671	3988641	3904751 ± 46580	2,06
25,0	4785191	4872770	4907005	4854989 ± 36314	1,29
30,0	5704128	5823954	5914601	5814228 ± 61025	1,82

\*: cada valor representa a média de três determinações

A representação da curva padrão e a equação da reta, obtida por regressão linear pelo método dos mínimos quadrados, encontra-se na Figura 4.12.

**FIGURA 4.12** – Representação gráfica da curva padrão de citral obtida por CLAE.

Os resultados dos tratamentos estatísticos sobre os valores experimentais obtidos para a curva padrão, através de análise de variância, encontram-se na Tabela 4.12.

**TABELA 4.12** – Análise de variância das áreas absolutas determinadas para a obtenção da curva padrão de citral por CLAE.

Fontes de Variação	GL	Soma dos Quadrados	Variância	F
Entre	4	2,74048. 10 <sup>13</sup>	6,85121. 10 <sup>12</sup>	1440,21*
- regressão	1	2,74048. 10 <sup>13</sup>	2,74048. 10 <sup>13</sup>	5760,83*
- desvio de linearidade	3	48723354,67	16241118,22	0,0034
Resíduo	10	47570891753	4757089175	
Total	14	2,74524. 10 <sup>13</sup>		

\*: significativo para  $p < 0,01$

Os valores experimentais obtidos no doseamento de citral no óleo volátil encontram-se nas Tabelas 4.13 e 4.14.

**TABELA 4.13** – Valores experimentais obtidos para a determinação de citral no óleo volátil, por CLAE.

Amostra	Concentração de citral (µg/ml)*	Teor (%)	Média ± e.p.m.	DPR
1	14,737	73,69		
2	14,998	74,99		
3	15,185	75,92		
4	14,769	73,85	75,20 ± 0,36	1,37
5	15,323	76,62		
6	15,083	75,41		
7	15,012	75,06		
8	15,205	76,02		

\*: cada valor representa a média de três determinações

**TABELA 4.14** – Valores experimentais obtidos na avaliação da precisão intermediária de citral no óleo volátil, por CLAE.

Amostra	Teor de citral (%)*			Média ± e.p.m.	DPR
	1º dia	2º dia	3º dia		
1	74,52	74,72	73,69		
2	74,68	74,89	74,99		
3	74,46	74,99	75,92	75,01 ± 0,20	1,12
4	75,49	74,67	73,84		
5	75,75	75,43	76,61		
6	76,38	73,74	75,41		

\*: cada valor representa a média de três determinações

Os valores experimentais obtidos no doseamento de citral nas formulações ENIO5, ENIO3, ENINC<sub>OV</sub> encontram-se nas Tabelas 4.15, 4.16, 4.17, 4.18 e 4.19.

**TABELA 4.15** – Valores experimentais obtidos para a determinação de citral na formulação ENIO5, por CLAE.

Amostra	mg citral/g*	Teor (%)	Média ± e.p.m.	DPR
1	38,49	101,29		
2	38,92	102,42		
3	38,96	102,53		
4	39,12	102,95	39,15 ± 0,19	1,36
5	39,44	103,79		
6	39,89	104,97		
7	39,85	104,87		
8	38,57	101,50		

\*: cada valor representa a média de três determinações

**TABELA 4.16** – Valores experimentais obtidos na avaliação da precisão intermediária de citral na formulação ENIO5, por CLAE.

Amostra	mg citral/g*			Média ± e.p.m.	DPR
	1º dia	2º dia	3º dia		
1	38,96	38,13	38,65		
2	38,92	38,15	38,31		
3	39,12	38,16	38,69	38,81 ± 0,13	1,39
4	39,44	38,25	38,61		
5	39,85	38,47	39,04		
6	39,89	38,82	39,06		

\*: cada valor representa média de três determinações

**TABELA 4.17** – Valores experimentais obtidos para a determinação de citral na formulação ENIO<sub>3</sub>, por CLAE.

Amostra	mg citral/g*	Teor (%)	Média ± e.p.m.	DPR
1	24,07	105,57		
2	23,85	104,60		
3	23,81	104,43	23,99 ± 0,06	0,59
4	23,94	105,00		
5	24,11	105,75		
6	24,15	105,92		

\*: cada valor representa a média de três determinações

**TABELA 4.18** – Valores experimentais obtidos para a determinação de citral na formulação ENINC<sub>OV</sub>, por CLAE.

Amostra	mg citral/g*	Teor (%)	Média ± e.p.m.	DPR
1	24,52	102,68		
2	24,43	102,30		
3	24,21	101,38		
4	24,50	102,59	24,17 ± 0,07	0,82
5	24,21	101,38		
6	24,05	100,71		
7	24,05	100,71		
8	24,09	100,88		

\*: cada valor representa a média de três determinações

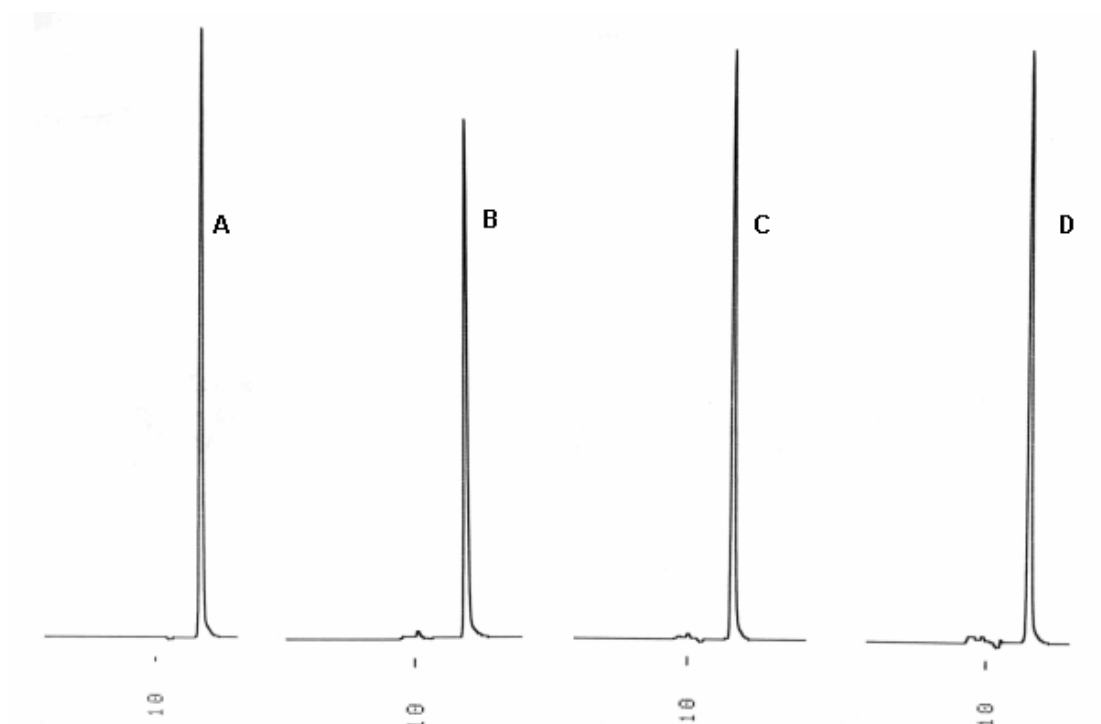
**TABELA 4.19** – Valores experimentais obtidos na avaliação da precisão intermediária de citral na formulação ENINC<sub>OV</sub>, por CLAE.

Amostra	mg citral/g*			Média ± e.p.m.	DPR
	1º dia	2º dia	3º dia		
1	24,52	24,56	23,77		
2	24,43	24,42	24,09		
3	24,21	24,60	24,34	24,19 ± 0,07	1,27
4	24,50	24,51	23,76		
5	24,21	24,61	23,73		
6	24,05	24,62	24,02		

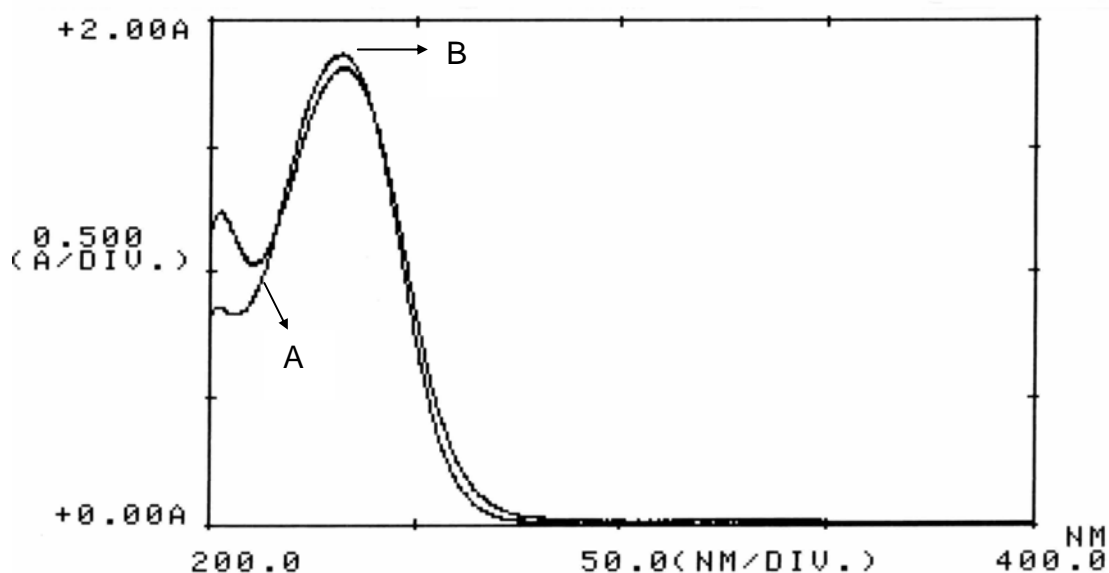
\*: cada valor representa a média de três determinações

Os cromatogramas obtidos por CLAE para o citral SQR, óleo volátil e formulações semi-sólidas encontram-se na Figura 4.13, e na Figura 4.14 estão representados os espectros de absorção na região do UV para o citral (SQR e formulação ENIO5).





**FIGURA 4.13** – Cromatogramas obtidos por CLAE para SQR (A), óleo volátil (B), formulação ENIO5 (C) e formulação ENINC<sub>OV</sub> (D) de citral, a 20 µg/ml. Condições cromatográficas: coluna Spherisorb 5CN<sup>®</sup> (250 mm x 4,6 mm, 5 µm) e pré-coluna Spherisorb 5CN<sup>®</sup> (10 mm x 4,6 mm, 5 µm); fase móvel *n*-hexano:etanol (85:15, v/v); fluxo 0,3 ml/min.; detecção 233 nm (1,0 AUFS); tempo de retenção 13,8 min.



**FIGURA 4.14** – Espectros de absorção no ultravioleta do citral em *n*-hexano, utilizando espectrofotômetro UV/VIS Shimadzu UV 16A. (A) SQR; (B) formulação ENIO5.

Os resultados obtidos nos testes de recuperação por CLAE estão apresentados nas Tabelas 4.20, 4.21 e 4.22.

**TABELA 4.20** – Valores experimentais do teste de recuperação realizado para o óleo volátil de *C. citratus* contendo citral, por CLAE.

Quantidade de SQR		% Recuperação*	DPR
Adicionada (µg/ml)	Recuperada (µg/ml)		
5,0	5,01	100,27	
10,0	9,81	98,11	1,11
12,5	12,35	98,81	

\*: cada valor representa a média de três determinações

**TABELA 4.21** – Valores experimentais do teste de recuperação realizado para a formulação ENIO5, por CLAE.

Quantidade de SQR		% Recuperação*	DPR
Adicionada (µg/ml)	Recuperada (µg/ml)		
5,0	4,80	96,01	
10,0	9,64	96,41	0,79
12,5	12,18	97,48	

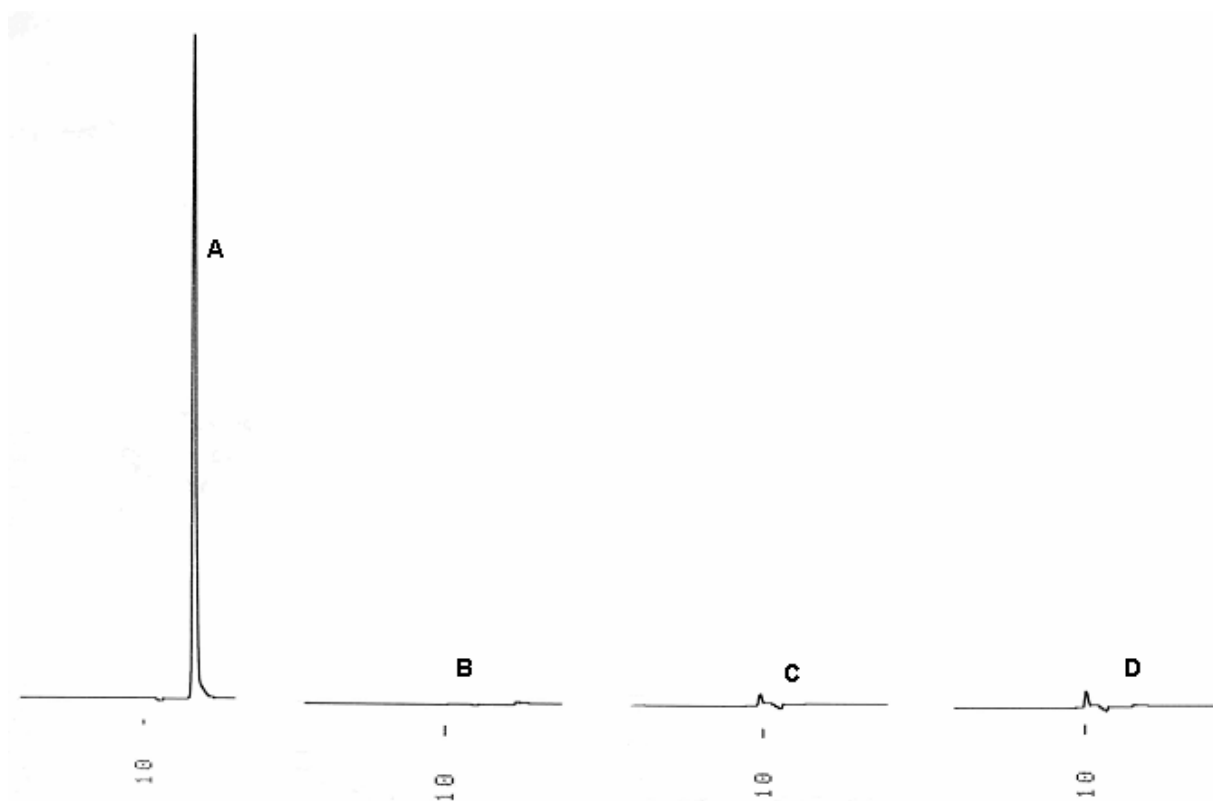
\*: cada valor representa a média de três determinações

**TABELA 4.22** – Valores experimentais do teste de recuperação realizado para a formulação ENINC<sub>OV</sub>, por CLAE.

Quantidade de SQR		% Recuperação*	DPR
Adicionada (µg/ml)	Recuperada (µg/ml)		
5,0	4,95	99,06	
10,0	9,77	97,68	1,30
12,5	12,53	100,26	

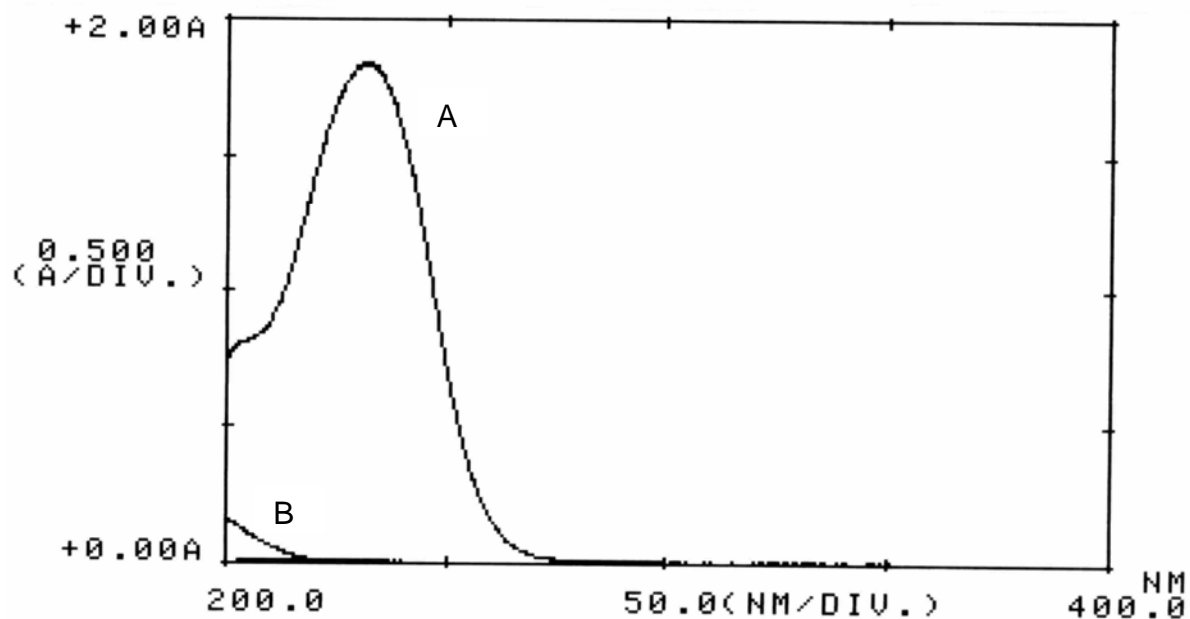
\*: cada valor representa a média de três determinações

Os cromatogramas obtidos para a solução de geraniol (2  $\mu\text{g/ml}$ ) e as bases semi-sólidas (ENI e ENINC) encontram-se na Figura 4.15.



**FIGURA 4.15** – Cromatogramas obtidos por CLAE para SQR (A), solução de geraniol (2  $\mu\text{g/ml}$ ) (B), base ENI (C) e base ENINC (D). Condições cromatográficas: coluna Spherisorb 5CN<sup>®</sup> (250 mm x 4,6 mm, 5  $\mu\text{m}$ ) e pré-coluna Spherisorb 5CN<sup>®</sup> (10 mm x 4,6 mm, 5  $\mu\text{m}$ ); fase móvel *n*-hexano:etanol (85:15, v/v); fluxo 0,3 ml/min.; detecção 233 nm (1,0 AUFS).

A Figura 4.16 apresenta os espectros de absorção de citral (SQR,) em comparação com o espectro da solução de geraniol, na região do UV.



**FIGURA 4.16** – Espectros de absorção no ultravioleta do citral em *n*-hexano (20  $\mu\text{g/ml}$ ) e solução de geraniol (2  $\mu\text{g/ml}$ ), utilizando espectrofotômetro UV/VIS Shimadzu UV 16A. (A) SQR, (B) geraniol.

#### 4.2.4.8 Discussão

Neste trabalho, desenvolveu-se um método analítico por CLAE para a quantificação de citral no óleo volátil e nas formulações semi-sólidas analisadas, empregando sistema de fase normal e detecção por espectroscopia de absorção molecular no UV. O método por CLAE desenvolvido neste estudo torna-se uma técnica alternativa para a quantificação desta substância no óleo volátil e nas preparações farmacêuticas.

As condições cromatográficas utilizadas no desenvolvimento do método analítico foram influenciadas pelas propriedades físico-químicas do óleo volátil e do citral, como solubilidade e absorção no UV. O citral é solúvel em solventes orgânicos, como éter etílico, hexano e etanol, e insolúvel em água (INDEX MERCK, 2000).

Comparando-se os espectros de absorção da amostra de óleo volátil com a SQR (Figura 4.11) observa-se uma similaridade entre eles, indicando tratar-se da mesma substância. Além disso, observa-se uma diferença na intensidade de absorção entre os espectros de citral SQR e na amostra de óleo volátil, demonstrando diferenças quantitativas entre eles. Esta variação quantitativa é esperada, uma vez que a quantidade de citral presente na amostra de óleo volátil é de 76%.

A cromatografia em fase normal baseia-se na adsorção de grupos polares da molécula nos grupos polares da fase estacionária, sendo o gel de sílica o sorvente mais utilizado, e a extensão com que o composto é retido dependerá, principalmente, de sua polaridade. Dentre as aplicações deste sistema, pode-se citar a análise de compostos muito lipofílicos, como na separação de diferentes classes de lipídios e na análise de tensoativos, que tendem a formar micelas nas condições usadas na cromatografia em fase reversa (WATSON, 1999).

Utilizou-se, no presente trabalho, uma coluna Spherisorb 5CN<sup>®</sup> (250 mm x 4,6 mm, 5 µm), que contém grupos cianopropil ligados ao gel de sílica, conferindo uma moderada polaridade, sendo empregada, também, na análise de tensoativos (WATSON, 1999). A escolha desta fase estacionária baseou-se no trabalho de HUDAIB e colaboradores (2001) e na solubilidade do óleo volátil, uma vez que a presença de solventes muito polares, como a água, impossibilitaria sua solubilização.

Para a extração do óleo volátil e do citral das formulações em estudo, utilizou-se como solvente etanol, possibilitando a solubilização dos componentes hidrofílicos e lipofílicos presentes nas emulsões, obtendo-se uma mistura homogênea dos mesmos, e por ser miscível em *n*-hexano. Em função destas características, não foi possível empregar o gel hidrofílico nesta análise, uma vez que apresentava uma elevada quantidade de água em sua composição, o que dificultou sua mistura nos solventes empregados, em especial, *n*-hexano.

A fase móvel, uma mistura de *n*-hexano e etanol (85:15, v/v), mostrou-se adequada, propiciando uma boa resolução do pico do citral e um tempo de retenção de

13,8 minutos (Figura 4.13). Além disso, o baixo fluxo da fase móvel empregado, aliado às condições cromatográficas utilizadas, proporcionou uma maior seletividade, uma vez que não foram verificadas interferências de impurezas e excipientes no pico cromatográfico do citral.

Outro parâmetro importante a ser considerado na análise cromatográfica se refere à temperatura, a qual foi mantida a  $25\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$  durante todas as análises. Cabe salientar que o citral, o óleo volátil e *n*-hexano são substâncias com elevada volatilidade, necessitando de cuidados especiais na sua manipulação, a fim de não comprometer as análises realizadas. Neste sentido, procurou-se manter a fase móvel em recipiente fechado, bem como as soluções de SQR e amostras acondicionadas em frascos de vidro âmbar, hermeticamente fechados.

O método analítico desenvolvido foi validado e os parâmetros avaliados compreenderam: linearidade, especificidade, precisão, exatidão, limites de detecção e quantificação.

A linearidade de um método analítico representa a sua habilidade em produzir resultados que são diretamente proporcionais à concentração da substância em análise, num determinado intervalo (ICH, 1996a; USP 28, 2005).

Os resultados obtidos na avaliação da linearidade do método proposto indicam que as soluções de citral apresentam correlação linear entre as áreas dos picos e as concentrações, nos intervalos utilizados. Gráficos de concentração *versus* áreas absolutas foram plotados e mostraram a linearidade do método, na faixa de concentração de 10 a 30  $\mu\text{g/ml}$ . O coeficiente de correlação obtido foi de 0,9991, indicando uma boa correlação entre os valores experimentais encontrados. A análise de variância dos valores das áreas absolutas demonstrou haver regressão linear significativa, não havendo desvio de linearidade, conforme está demonstrado na Tabela 4.12.

A precisão de um método analítico representa o grau de concordância de uma série de leituras, resultante da aplicação repetida do método a amostras

homogêneas. Pode ser avaliada pela reprodutibilidade, repetibilidade (intradia) ou precisão intermediária (interdia), sendo expressa pelo desvio padrão relativo (DPR). A reprodutibilidade se refere aos resultados obtidos de uma amostra analisada em diferentes laboratórios, em diferentes dias e avaliada por diferentes analistas, em diferentes equipamentos; a repetibilidade é medida em função dos valores encontrados através de várias reproduções do método, nas mesmas condições de análise, em um curto intervalo de tempo; a precisão intermediária, por sua vez, representa o efeito das variações dentro do laboratório devido a diferentes efeitos, como dias, analistas ou equipamentos (ICH, 1996a; USP 28, 2005). Neste trabalho avaliou-se a repetibilidade e a precisão intermediária do método analítico.

Os resultados obtidos demonstraram a precisão do método, obtendo-se baixos valores de DPR na avaliação da repetibilidade (1,37; 0,59; 1,36 e 0,82 para o óleo volátil, formulação ENIO3, ENIO5 e ENINC<sub>OV</sub>, respectivamente) e na precisão intermediária (1,12; 1,39 e 1,27, para o óleo volátil, formulação ENIO5, e ENINC<sub>OV</sub>, respectivamente).

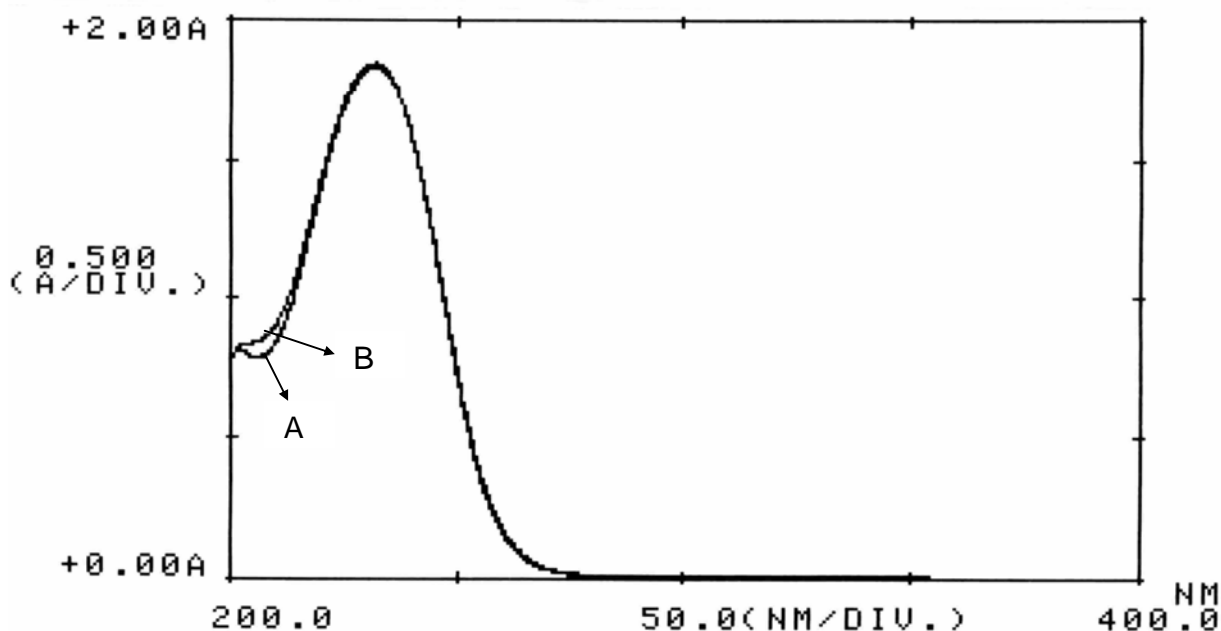
O teor de citral encontrado na amostra de óleo volátil por CLAE foi de 75%. Este resultado assemelha-se ao obtido na quantificação de citral por CG (76%). Para as formulações semi-sólidas, o teor médio de citral foi 105,22%, 102,12% e 101,63% para as preparações ENIO3, ENIO5 e ENINC<sub>OV</sub>, respectivamente.

Os resultados nos testes de recuperação demonstraram a boa exatidão do método. A recuperação média foi de 99,06%, 96,63% e 99,0% para o óleo volátil e formulações ENIO5 e ENINC<sub>OV</sub>, respectivamente.

Os limites de quantificação e de detecção foram 0,36 µg/ml e 0,12 µg/ml, respectivamente e indicaram a boa sensibilidade do método cromatográfico.

A especificidade de um método é definida como a habilidade em avaliar de forma inequívoca a substância de interesse na presença de componentes que poderiam interferir na sua determinação, como excipientes, impurezas, contaminantes ou produtos de degradação, por exemplo (ICH, 1996a; USP 28, 2005). No método de

CLAE desenvolvido, a especificidade foi avaliada empregando-se outra substância presente no óleo volátil (geraniol) e a base não-iônica. As análises não demonstraram interferências no pico cromatográfico do citral (Figura 4.15). Testes complementares, foram, também, realizados por espectroscopia de absorção na região do UV, comparando-se os espectros de absorção do citral e do geraniol. O geraniol (2  $\mu\text{g/ml}$ ) apresentou uma pequena absorção na região do ultravioleta (aproximadamente, 200 nm); entretanto, no comprimento de onda máximo de absorção do citral (233 nm) não houve interferências (Figura 4.16). Um outro teste realizado foi quantificar a amostra de óleo volátil em presença da solução de geraniol. Para tal, preparou-se uma solução contendo, aproximadamente, 15 e 2  $\mu\text{g/ml}$  de óleo volátil e de geraniol, respectivamente, a qual foi injetada no cromatógrafo. A área obtida para o óleo volátil (sem a presença de geraniol) foi de 2935938, e para a amostra acrescida da solução de geraniol foi de 2900413. Da mesma forma, a solução padrão foi, também, acrescida da solução de geraniol e, pelo espectro de absorção obtido para as amostras, não observou-se mudanças no perfil de absorção do citral (Figura 4.17).



**FIGURA 4.17** – Espectros de absorção no ultravioleta do citral em *n*-hexano, utilizando espectrofotômetro UV/VIS Shimadzu UV 16A. (A) SQR, (B) SQR e geraniol.



O método proposto mostrou-se adequado, apresentando linearidade, precisão, exatidão e especificidade.

#### 4.2.5 IRRITAÇÃO CUTÂNEA PRIMÁRIA

A avaliação do potencial de irritação cutânea das formulações ENI03, ENIO5 e ENINC<sub>OV</sub> foi realizada através de metodologia *in vitro* e *in vivo*. Além destas, formulações controle (ENI e ENINC) foram, também empregadas.

Os ensaios foram realizados no Instituto Adolfo Lutz, nas Seções de Cosméticos (ensaios *in vivo*) e de Culturas Celulares (ensaios *in vitro*), sob orientação da Profa. Dra. Terezinha de Jesus Andreoli Pinto (Programa de Pós-Graduação em Fármaco e Medicamentos – USP).

O projeto de tese foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da UFRGS e pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da USP, estando de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) (Anexos 10.11 e 10.12).

##### 4.2.5.1 Testes *in vivo*

Para a avaliação *in vivo* da irritação cutânea primária das formulações em estudo, empregou-se coelhos albinos, de ambos os sexos, da raça Nova Zelândia, pesando de 2,0 a 2,5 kg. Os animais foram adquiridos da CRIEX Curicultura Ltda e mantidos no biotério central do Instituto Adolfo Lutz, em gaiolas individuais, à temperatura de 22 °C ± 1 °C e umidade relativa de 30 a 70%, com água e ração “*ad libitum*”. Para cada amostra, seis animais foram utilizados.

A região dorsal dos coelhos foi tricotomizada, com auxílio de depilador automático, 24 horas antes do início do ensaio, e dividida em duas regiões, aplicando-se a amostra (0,5 g) em uma das áreas, com massagens leves, sendo a outra (sem aplicação do produto), utilizada como controle. A seguir, cada área foi coberta com gaze estéril e a região dorsal foi envolvida com nova camada de gaze, fixada, posteriormente, com fita hipoalergênica. Após quatro horas, a bandagem oclusiva foi

removida, e as leituras de edema e eritema foram realizadas 24 e 72 horas após a aplicação única das amostras. A formação de edema é verificada pela espessura da pele dobrada, medindo-se com o auxílio de paquímetro calibrado.

Os resultados foram expressos de acordo com uma escala de graduação das reações cutâneas (INCQS, 2002):

**a) Formação de eritema**

**Grau 0:** pele normal, sem eritema, geralmente de cor branca, podendo apresentar-se levemente rósea;

**Grau 1:** eritema leve, pele ligeiramente avermelhada, onde se percebe uma tonalidade diferente da área controle;

**Grau 2:** eritema bem definido, pele vermelha, geralmente em toda a área;

**Grau 3:** eritema moderado, pele de coloração vermelha intensa e difusa, em toda a área;

**Grau 4:** eritema severo, pele de coloração vermelha escura com leve formação de escaras (injúrias em profundidade).

**b) Formação de edema**

**Grau 0:** normal, valor de edema entre zero e 0,24 mm;

**Grau 1:** edema muito leve (pouco perceptível), valor de edema compreendido entre 0,25 mm a 0,49 mm;

**Grau 2:** edema leve, áreas com bordas bem definidas por aumento perceptível, valor de edema compreendido entre 0,50 mm a 0,74 mm;

**Grau 3:** edema moderado (bastante perceptível), valor de edema compreendido entre 0,75 mm a 1 mm;

**Grau 4:** edema severo, valor de edema maior que 1 mm, podendo, às vezes, ser maior do que a área de exposição.

A partir dos valores obtidos para as reações produzidas e observadas na pele dos animais, calcula-se o Índice de Irritação Primária (IIP) para cada amostra, classificando-a, de acordo com o modelo:

<b>Índice</b>	<b>Classificação</b>
0,0 a 0,9	Não irritante
1,0 a 1,9	Ligeiramente irritante
2,0 a 4,9	Moderadamente irritante
5,0 a 8,0	Severamente irritante

#### **4.2.5.2 Testes *in vitro***

A avaliação *in vitro* das formulações em estudo foi realizada através da citotoxicidade, tendo como parâmetro a viabilidade celular. O método empregado foi o de difusão em ágar (USP 28, 2005).

Os ensaios foram realizados em capela de fluxo laminar vertical, alojada em sala limpa, com sistema de filtro absoluto e pressão positiva. Os materiais empregados nos ensaios foram previamente esterilizados e as análises foram realizadas utilizando-se técnicas assépticas.

Para a execução dos ensaios utilizou-se linhagem de células NCTC clone 929 (ATCC-CCL 1), proveniente de células de tecido conjuntivo de camundongo, as quais foram cultivadas em meio mínimo de Eagle, suplementado com 0,1 mM de aminoácidos não essenciais, 1,0 mM de piruvato de sódio e 10% de soro fetal bovino, sem antibiótico (MEM com 10% SFB).

A manutenção das culturas celulares foi realizada a 36 °C, em garrafas de 250 ml, e os repiques foram realizados em intervalos de 72 horas. A dispersão da monocamada celular foi efetuada empregando-se uma associação de tripsina 0,20% e

versena 0,02% (ATV). Após, as células foram novamente suspensas nos respectivos meios de cultura e distribuídos em garrafas (para manutenção) e em placas de Petri (para a execução do teste).

#### 4.2.5.2.1 Procedimento

Para a obtenção da monocamada, as células foram semeadas em volumes de 5 ml, em placas de Petri (60 x 15 mm), na concentração de  $3,0 \times 10^5$  células/ml, mantidas por 48 horas, à temperatura de 37 °C, em atmosfera úmida, contendo 5% de CO<sub>2</sub>. Após, o meio de cultura foi desprezado e adicionou-se 5 ml de meio *overlay* em cada placa. Este meio é composto por partes iguais de MEM, duas vezes concentrado, e ágar (BBL - Becton Dickinson) a 1,8%, contendo 0,01% de vermelho neutro (Merck) como corante vital. Após, discos de papel (0,5 cm de diâmetro), atóxicos, foram embebidos nas amostras e colocados sobre a camada do ágar, antes de sua completa solidificação. Posteriormente, as placas foram incubadas em estufa, contendo 5% de CO<sub>2</sub>, à temperatura de 37 °C, durante 24 horas. Empregou-se quatro placas para cada amostra testada.

Utilizou-se como controles positivo e negativo fragmentos de látex (0,5 cm) e discos de papel filtro (0,5 cm), respectivamente.

As placas foram avaliadas macro e microscopicamente, e a citotoxicidade foi verificada pela presença de um halo claro sob ou ao redor da amostra. Os diâmetros dos halos presentes foram medidos com auxílio de paquímetro calibrado.

Os resultados foram expressos de acordo com o Índice de Zona (IZ) (USP 28, 2005), utilizando-se a média dos diâmetros, subtraindo-se 0,5 cm, referente ao diâmetro do disco de papel. Para se obter a medida da toxicidade, o resultado final foi, então, dividido por quatro. O efeito tóxico é verificado de acordo com a seguinte escala de graduação (USP 28, 2005):

<b>IZ</b>	<b>Observações</b>	<b>Reatividade</b>
0	Ausência de efeito ao redor ou sob a amostra	Nenhuma
1	Alteração ou degeneração celular sob a amostra	Fraca
2	Halo claro limitado sob a amostra	Leve
3	Halo entre 0,5 e 1,0 cm a partir da amostra	Moderada
4	Halo claro maior que 1,0 cm a partir da amostra	Severa

#### 4.2.5.3 Resultados

A aplicação de uma dose única de 0,5 g das formulações contendo o óleo volátil na pele dos animais provocou um certo grau de irritação. Após a retirada do curativo oclusivo, a pele dos animais apresentou-se amarelada, especialmente, em locais com uma certa quantidade de pêlos. Durante o experimento, a intensidade da cor foi diminuindo, quase que totalmente até 72 horas, não comprometendo as leituras das reações. Os valores de edema e eritema, bem como os Índices de Irritação Primária encontram-se nas Tabelas 4.23 e 4.24, respectivamente.

**TABELA 4.23** – Valores de edema e eritema observados após a aplicação das formulações em estudo (ENI, ENINC, ENIO3, ENIO5 e ENINC<sub>OV</sub>).

<b>Formulação</b>	<b>Leitura 24 horas*</b>		<b>Leitura 72 horas*</b>	
	<b>Edema</b>	<b>Eritema</b>	<b>Edema</b>	<b>Eritema</b>
ENI	0	1	0	0
ENINC	0	0	0	0
ENIO3	0	1	0	1
ENIO5	0	1	0	2
ENINC <sub>OV</sub>	0	1	0	1

\*: cada valor corresponde à média de 6 determinações

**TABELA 4.24** – Índices de Irritação Primária (IIP) obtidos para as formulações em estudo (ENI, ENINC, ENIO3, ENIO5 e ENINC<sub>OV</sub>).

Formulação	IIP	Classificação
ENI	0,5	Não irritante
ENINC	0,0	Não irritante
ENIO3	1,0	Ligeiramente irritante
ENIO5	1,5	Ligeiramente irritante
ENINC <sub>OV</sub>	1,0	Ligeiramente irritante

Os resultados obtidos na avaliação da citotoxicidade, através da medida do diâmetro dos halos de toxicidade para as formulações, encontram-se na Tabela 4.25.

**TABELA 4.25** – Diâmetros dos halos de toxicidade (cm) obtidos para as formulações em estudo (ENI, ENINC, ENIO3, ENIO5 e ENINC<sub>OV</sub>), empregando a linhagem celular NCTC clone 929.

Diâmetro do halo de toxicidade (cm)*						
ENI	ENINC	ENIO3	ENIO5	ENINC <sub>OV</sub>	Controle positivo	Controle negativo
-	-	0,51	> 1,0	0,23	0,78	-

-: sem efeito tóxico

\*: cada valor corresponde á média de 4 determinações

Na Tabela 4.26 encontram-se os valores de Índice de Zona (IZ) obtidos para as formulações, pela medida dos halos de toxicidade.

**TABELA 4.26** – Citotoxicidade das formulações graduada em Índice de Zona (IZ), segundo a USP 28, 2005.

Formulação	IZ	Reatividade
ENI	0	Nenhuma
ENINC	0	Nenhuma
ENIO3	3	Moderada
ENIO5	4	Severa
ENINC <sub>OV</sub>	2	Leve
Controle negativo	0	Nenhuma
Controle positivo	3	Moderada

#### 4.2.5.4 Discussão

Os ensaios *in vivo* realizados neste trabalho objetivaram verificar o potencial de irritação cutânea das emulsões contendo o óleo volátil, através da aplicação dos produtos na pele tricotomizada de coelhos. Esta metodologia possibilita classificar os produtos em quatro categorias, de acordo com o Índice de Irritação Primária (IIP) obtido para cada amostra.

Os valores de IIP encontrados para as formulações ENIO3, ENIO5 e ENINC<sub>OV</sub> foram 1,0; 1,5 e 1,0, respectivamente. Assim, as formulações contendo o óleo volátil, em diferentes concentrações, foram classificadas como ligeiramente irritantes. Formulações controle (ENI e ENINC), apresentaram valores de IIP inferior a 0,5, sendo classificadas como não irritantes (Tabela 4.24).

Em virtude destes resultados, uma nova formulação foi preparada, contendo o óleo volátil a uma concentração de 1,5% (m/m). O valor do IIP obtido para esta formulação foi de 1,0, classificando-a, também, como ligeiramente irritante. Desta forma, verifica-se que a concentração do óleo volátil presente nas amostras, na faixa de 1,5 a 5,0% (m/m), não interferiu no seu potencial de irritação.



O teste de citotoxicidade empregando a linhagem de células NCTC clone 929 é um método oficial para a avaliação da toxicidade de plásticos e materiais poliméricos, adotado pela American Society for Testing and Materials (ASTM), bem como pela Farmacopéia Americana (USP 28, 2005).

O teste baseia-se na medida da viabilidade celular, empregando-se vermelho neutro como indicador (cloreto de 3-amino-7-dimetilamino-2-metilfenazina) (GUESS *et al.*, 1965; USP 28, 2005). O vermelho neutro em pH fisiológico passa facilmente através da membrana plasmática e se concentra no interior dos lisossomas. A quantidade de corante no interior das células é diretamente proporcional à viabilidade das mesmas, e alterações no pH ou perda da permeação da membrana inibem a incorporação deste corante (EUN; SUH, 2000). Assim, havendo efeito tóxico sob as mesmas (degeneração celular e má formação), as células mortas são descoradas, ocorrendo a formação de um halo claro ao redor da amostra, cuja medida fornece o diâmetro do halo formado, indicando, desta maneira, o efeito tóxico.

De posse dos resultados verificou-se que as formulações contendo o óleo volátil apresentaram efeito tóxico para as células, obtendo-se valores de IZ de 2 (leve) para a formulação ENINC<sub>OV</sub>, 3 (moderado) para a formulações ENIO3, e 4 (severo) para a formulação ENIO5 (Tabela 4.26). Para esta amostra, a análise microscópica demonstrou a ocorrência de lise celular na maioria das células, ausência de células viáveis e um número bastante reduzido de células coradas, somente na extremidade da placa de Petri. A formulação ENIO1,5 apresentou halo médio de toxicidade de 0,15 cm, sendo classificada como levemente irritante (IZ = 2). As formulações controle (ENI e ENINC) não demonstraram efeito tóxico (IZ = 0).

Desta forma, verificou-se que o óleo volátil é tóxico para as culturas celulares e quando empregado a uma concentração de 5% (m/m) ocasionou a morte da maioria das células, obtendo-se halos de citotoxicidade superiores a 1,0 cm. Este efeito citotóxico pode estar relacionado ao modo de ação da atividade antimicrobiana apresentada pelo óleo volátil, especialmente pelo citral, uma vez que os efeitos

antibacteriano e antifúngico se devem, principalmente, à destruição da membrana celular dos microrganismos, conforme já relatado neste trabalho.

A inibição do crescimento microbiano está relacionada aos efeitos tóxicos causados por compostos voláteis nas células, alterando suas funções biológicas, além de provocar lise celular e destruição de suas estruturas. Estes fenômenos são, também, observados nos ensaios de citotoxicidade, mecanismos pelos quais verifica-se a presença de substâncias irritantes ou corrosivas. Tal associação é sugerida por PRASHAR e colaboradores (2004) na avaliação da citotoxicidade do óleo de *Lavandula augustifolia* e de seus componentes. Neste sentido, a ocorrência de efeito tóxico com formulações contendo o óleo volátil poderia ser pressuposta.

Com o teste de citotoxicidade empregando o método de difusão em ágar e linhagem celular NCTC clone 929 foi possível, também, observar diferenças no potencial de irritação apresentado para as formulações contendo o óleo volátil, ao contrário dos ensaios *in vivo*. Este fato pode estar relacionado à metodologia empregada no teste *in vitro* e às diferentes concentrações de óleo volátil utilizadas. Os diâmetros dos halos de citotoxicidade obtidos para as formulações ENIO1,5; ENIO3, ENIO5 e ENINC<sub>OV</sub> foram 0,15; 0,51; > 1,0 e 0,23 cm, respectivamente (Tabela 4.25). Verifica-se que quanto maior a concentração de óleo na formulação, maior seu efeito tóxico. Através da técnica empregada, observa-se que o efeito citotóxico do óleo volátil é dose-dependente e, em concentrações iguais ou superior a 5%, obtém-se o máximo de sua toxicidade.

Partindo-se destas observações, verifica-se, também, a potencialização do óleo sobre as culturas celulares, de maneira semelhante ao que ocorre na inibição do crescimento da levedura de *C. albicans*, empregando-se o método microbiológico de difusão em ágar. Em ambas metodologias o fenômeno observado é a formação de um halo claro ao redor das células, decorrente da ação tóxica (culturas celulares) ou inibitória (levedura) do óleo volátil sobre as mesmas, e que, em determinadas concentrações, percebe-se sua morte (ou inibição) quase total.

Ainda, sob o ponto de vista tecnológico, com a técnica de culturas celulares foi possível, também, avaliar diferenças em relação à toxicidade apresentada pelas formulações, incorporando-se o óleo volátil em diferentes preparações. A formulação ENINC<sub>OV</sub> apresentou menor halo de toxicidade (0,23 cm) em relação à formulação ENIO3 (0,51 cm), as quais possuem, em sua composição, um percentual de óleo volátil similar. Desta forma, a incorporação do óleo volátil em suspensões de NC possibilitou o desenvolvimento de uma formulação com um menor grau de toxicidade, protegendo-o, por hipótese, da volatilidade, resultando em uma menor difusão do mesmo, de acordo com a metodologia empregada.

O teste *in vitro* utilizado neste estudo empregou células de tecido conjuntivo de camundongo e foi utilizado para determinar e comparar a toxicidade de formulações contendo o óleo volátil de *C. citratus*. O potencial de irritação das formulações, graduado em IZ, foi maior em relação ao IIP obtido nos ensaios *in vivo*, evidenciando a maior sensibilidade apresentada pelas linhagens celulares em relação aos animais de laboratório. No teste *in vitro* verificou-se a citotoxicidade basal, ou seja, a habilidade de uma substância em causar morte celular, decorrente de danos na função básica da célula (EUN; SUH, 2000), não reproduzindo, exatamente, a resposta biológica apresentada pelo homem, em virtude das diferenças morfológicas e bioquímicas entre as culturas celulares e a pele intacta.

Em relação às formulações desenvolvidas neste trabalho, os ensaios *in vivo* parecem ser mais adequados, uma vez que a resposta biológica apresentada pela espécie animal, reproduz, de maneira mais semelhante à humana. Os testes *in vitro*, em virtude de sua fundamentação e sensibilidade da cultura celular, demonstraram um maior potencial irritante para as preparações, diferenciando-se dos obtidos no modelo animal. Contudo, o método de difusão em ágar foi capaz de diferenciar as amostras irritantes (formulações contendo o óleo volátil) e não irritantes (formulações controle), assim como demonstrar sua valiosa aplicação em investigar tendências de efeitos citotóxicos dos insumos empregados nas formulações, confirmando sua importância nos estudos de desenvolvimento de novos produtos.

Óleos ou substâncias voláteis são usualmente empregados como fragrâncias em diversas preparações cosméticas e como aromatizantes em alimentos, e podem provocar irritação, reações de sensibilização e efeitos fototóxicos, decorrentes da natureza química de algumas substâncias, ao uso freqüente das preparações e da concentração empregada (GROOT; FROSCH, 1997). Tendo em vista estas observações, verifica-se que os resultados obtidos na avaliação do potencial de irritação das formulações contendo o óleo volátil de *C. citratus* são satisfatórios e atendem aos critérios estabelecidos para a utilização tópica destes produtos, apresentando grau de irritação conhecido e baixo (ligeiramente irritante), nas diferentes concentrações utilizadas.

## 4.2.6 ESTUDOS DE ESTABILIDADE

No presente estudo, testes acelerados de estabilidade foram realizados, a fim de obter informações sobre a estabilidade do óleo volátil, particularmente, do citral e das formulações desenvolvidas neste trabalho (ENIO3, ENIO5 e ENINC<sub>OV</sub>). Para a realização dos ensaios, nova amostra comercial de óleo volátil foi adquirida (Destilaria Maripá, PR) e a concentração de citral foi determinada por CG e CLAE. O óleo volátil apresentou um teor de citral de 78,5% e 77,6%, nas análises por CG e CLAE, respectivamente.

### 4.2.6.1 Cinética de degradação fotoquímica do óleo volátil

#### 4.2.6.1.1 Condições de estudo

Com o objetivo de avaliar a influência da luz, amostras de óleo volátil e de citral (SQR) foram submetidas à seguinte condição: 600 µl foram colocados em cubetas descartáveis (Brand – UV/VIS, Semi-micro, 10 mm caminho ótico), à distância de, aproximadamente, 10 cm da lâmpada germicida *Ecolume ZW* (254 nm) de 30 W. A reação foi realizada em câmara com 100 x 16 x 16 cm, espelhada internamente. A temperatura no interior da câmara foi de 27 °C ± 2 °C. As cubetas foram tampadas com tampa de teflon, envoltas com parafilme para evitar a evaporação das amostras, as quais foram expostas por 4, 8, 10, 12 e 16 dias (n = 3).

O acompanhamento da degradação das amostras foi realizado por CLAE, verificando mudanças na concentração de citral, de acordo com as condições cromatográficas descritas no item 4.2.4.2 (Tabela 4.10). As amostras de óleo volátil e de citral correspondentes a cada tempo de coleta foram misturadas e após, pesou-se 25 mg e diluiu-se em *n*-hexano, até obter a concentração teórica de 20 µg/ml. Para cada período de exposição foram realizadas três determinações.

Através dos resultados obtidos de concentração de citral em cada tempo de armazenamento, construiu-se gráficos (concentração *versus* tempo), a partir dos quais pode-se estimar a ordem de reação para o óleo volátil e para o citral, nas condições experimentais empregadas.

Adicionalmente, as amostras de óleo volátil e de citral (SQR) foram, também, avaliadas em relação a sua atividade antifúngica. O ensaio foi realizado para as amostras submetidas à fotodegradação por 16 dias, empregando-se a cepa de *C. albicans* ATCC 10231, de acordo com a metodologia descrita no item 4.2.1.2.

#### **4.2.6.2 Estabilidade térmica das formulações**

##### **4.2.6.2.1 Condições de estudo**

As formulações ENIO3, ENIO5 e ENINC<sub>OV</sub> foram submetidas a diferentes condições de temperatura, com o objetivo de avaliar a influência deste parâmetro na concentração de citral e na estabilidade física das preparações. As amostras foram preparadas e armazenadas de acordo com as condições descritas a seguir:

1. Três lotes de cada formulação (ENIO3 e ENIO5 e ENINC<sub>OV</sub>) (3 x 200 g) foram preparados e 25 g de cada emulsão foram acondicionados em frascos plásticos de parede dupla, com tampa rosqueável (total de 21 frascos/formulação). Após 48 horas, as amostras foram armazenadas em geladeira, a temperatura de  $7\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ , durante seis meses. Em intervalos de tempo de 0, 30, 60, 90, 120, 150 e 180 dias, três amostras de cada formulação foram avaliadas.
2. Três lotes de cada formulação (ENIO3 e ENIO5 e ENINC<sub>OV</sub>) (3 x 200 g) foram preparados e 25 g de cada emulsão foram acondicionados em frascos plásticos de parede dupla, com tampa rosqueável (total de 12 frascos/formulação). Após 48 horas, as amostras foram armazenadas em estufa, a temperatura de  $25\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ , durante três meses. A temperatura e a umidade relativa foram controladas por

termômetro digital e higrômetro (Thermo Meter). Em intervalos de tempo de 0, 30, 60 e 90 dias, três amostras de cada formulação foram avaliadas.

- Três lotes das formulações ENIO3 e ENIO5 (3 x 150 g) foram preparados e 25 g de cada emulsão foram acondicionados em frascos plásticos de parede dupla, com tampa rosqueável (total de 15 frascos/formulação). Para a formulação ENINC<sub>OV</sub> foram preparados três lotes de 210 g cada. Após 48 horas, as amostras foram armazenadas em câmara climática (Nova Ética 420 CLD, Vargem Grande Paulista, SP), a temperatura de 40 °C ± 2 °C e umidade relativa de 75% ± 5%, durante dois meses. Em intervalos de tempo de 0, 15, 30, 45 e 60 dias, três amostras de cada formulação foram avaliadas.

#### 4.2.6.2.2 Testes empregados

Após cada intervalo de tempo pré-estabelecido, as formulações (n = 3) foram avaliadas em relação a suas propriedades físico-químicas (características organolépticas e pH) e à concentração de citral, por CLAE, de acordo com as metodologias descritas neste trabalho.

O conteúdo de três embalagens, utilizadas em cada período de coleta, para cada formulação, foi retirado e as amostras foram homogeneizadas em gral de porcelana. A partir desta mistura, procederam-se as análises. Para a análise quantitativa, pesou-se o equivalente a 25 mg de citral e as amostras foram preparadas de acordo com o item 4.2.4.4.2.

### 4.2.6.3 Resultados

#### 4.2.6.3.1 Cinética de degradação fotoquímica do óleo volátil

Na análise macroscópica do óleo volátil após o teste de fotodegradação verificou-se que as amostras mantidas durante 8 dias de exposição à luz germicida apresentaram odor menos intenso do óleo volátil, mantendo a coloração original. Após 12 dias percebeu-se alterações mais acentuadas no odor e na cor do óleo, e um aspecto mais viscoso do mesmo. Resultados semelhantes foram, também, obtidos para o citral (SQR).

A Tabelas 4.27 e 4.28 apresentam os resultados dos teores de citral na amostra de óleo volátil e de citral (SQR), em função do tempo, obtidos a partir de amostras mantidas à fotodegradação.

**TABELA 4.27** – Teores de citral no óleo volátil em função do tempo, obtidos a partir de amostras mantidas à luz UV (254 nm).

Tempo (dias)	Teor de citral no óleo volátil (%)*	Teor de citral total (%)	DPR
0	77,64	100,00	0,33
4	71,19	91,69	1,74
8	65,35	84,17	3,30
12	61,93	79,77	0,37
16	47,20	60,79	0,39

\*: cada valor representa a média de três determinações



**TABELA 4.28** – Teores de citral na SQR em função do tempo, obtidos a partir de amostras mantidas à luz UV (254 nm).

Tempo (dias)	Teor de citral (%)*	DPR
0	100,00	1,75
4	88,64	1,42
8	79,28	1,79
10	70,92	0,84
12	44,76	0,72
16	47,21	1,02

\*: cada valor representa a média de duas determinações

A partir dos dados experimentais de concentração (C) *versus* tempo (t), determinou-se a ordem de reação seguida pelas amostras, tomando-se como base a correlação existente entre as duas variáveis (concentração e tempo) (Tabelas 4.29 e 4.30).

**TABELA 4.29** – Valores de coeficientes de correlação, considerando diferentes ordens de reação, obtidos a partir das amostras de óleo volátil submetidas a degradação sob luz UV (254 nm).

Tempo (dias)	Reação de ordem zero Teor de citral (%)	Reação de primeira ordem log C	Reação de segunda ordem 1/C
0	100,00	2,0000	0,0100
4	91,69	1,9623	0,0109
8	84,17	1,9252	0,0119
12	79,77	1,9018	0,0125
16	60,79	1,7838	0,0165
r*	0,9690	0,9494	0,9250

\*: coeficiente de correlação

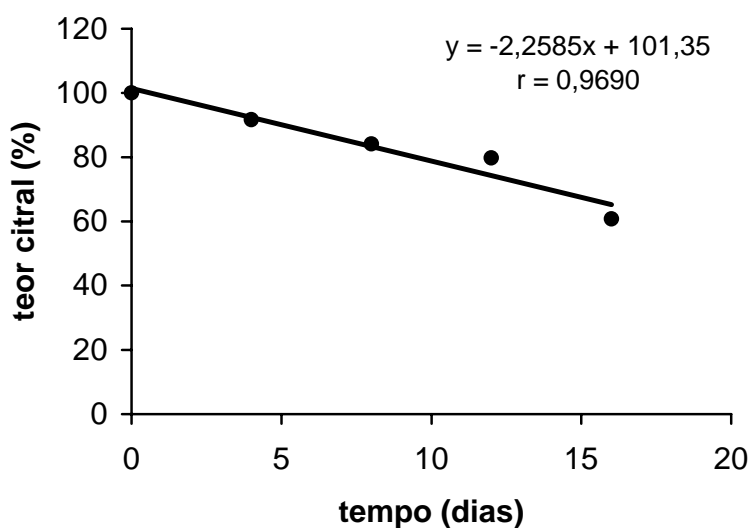
**TABELA 4.30** – Valores de coeficientes de correlação, considerando diferentes ordens de reação, obtidos a partir das amostras de citral (SQR) submetidas à degradação sob luz UV (254 nm).

Tempo (dias)	Reação de ordem zero Teor de citral (%)	Reação de primeira ordem log C	Reação de segunda ordem 1/C
0	100,00	2,0000	0,0100
4	88,64	1,9476	0,0113
8	79,28	1,8992	0,0126
10	70,92	1,8508	0,0141
12	44,76	1,6509	0,0223
16	47,21	1,6740	0,0212
r*	0,9437	0,9138	0,8782

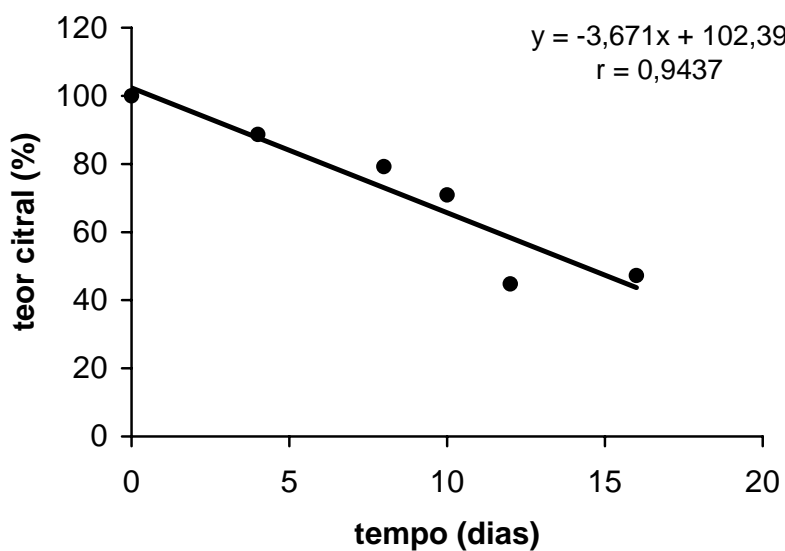
\*: coeficiente de correlação

A combinação dos pares de valores de C *versus* t, log C *versus* t ou 1/C *versus* t mostrará se a reação é de ordem zero, primeira ou segunda ordens, respectivamente (LACHMAN *et al.*, 2001; NUDELMAN, 1975).

Comparando-se os coeficientes de correlação, obtidos por regressão linear, foi possível verificar que a cinética de reação que melhor descreve a diminuição do teor de citral em função do tempo é a ordem zero. As Figuras 4.18 e 4.19 demonstram o perfil de concentração de citral em função do tempo e a respectiva equação da reta para o óleo volátil e para o citral (SQR), respectivamente.



**FIGURA 4.18** – Representação gráfica da fotodegradação de citral em função do tempo, obtida a partir de amostras do óleo volátil, armazenadas sob luz UV (254 nm).



**FIGURA 4.19** – Representação gráfica da fotodegradação de citral em função do tempo, obtida a partir de amostras da SQR, armazenadas sob luz UV (254 nm).

Após a determinação da ordem de reação, pode-se calcular os valores das velocidades de degradação (K) para cada tempo (t), a partir da equação  $K = (C_0 - C)/t$ , onde  $C_0$  corresponde à concentração inicial de citral e C à concentração de citral no tempo "t". O valor de K médio foi, então, obtido a partir da média aritmética dos valores de K para cada tempo e, também, determinado pela inclinação da reta. Os resultados obtidos encontram-se nas Tabelas 4.31 e 4.32 e nas Figuras 4.18 e 4.19.

**TABELA 4.31** – Valores das velocidades de degradação (K) de citral, obtidos segundo uma cinética de ordem zero, para o óleo volátil.

Tempo (dias)	Teor de citral (%)	Valor de K (dias <sup>-1</sup> )	K médio
0	100,00	-	
4	91,69	2,08	
8	84,17	1,98	2,05
12	79,77	1,69	
16	60,79	2,45	

**TABELA 4.32** – Valores das velocidades de degradação (K) de citral, obtidos segundo uma cinética de ordem zero, para a SQR.

Tempo (dias)	Teor de citral (%)	Valor de K (dias <sup>-1</sup> )	K médio
0	100,00	-	
4	88,64	2,84	
8	79,28	2,59	3,25
10	70,92	2,91	
12	44,76	4,60	
16	47,21	3,30	

Na avaliação da atividade antifúngica das amostras de óleo volátil e de citral (SQR), submetidas à fotodegradação, por 16 dias, verificou-se uma diminuição do halo de inibição formado, em comparação com amostras não degradadas. Os resultados obtidos encontram-se na Tabela 4.33.

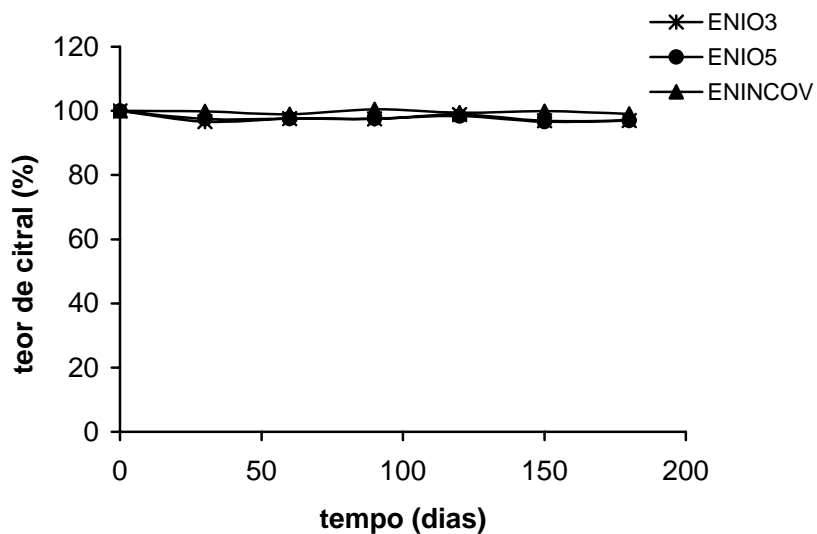
**TABELA 4.33** – Valores dos diâmetros dos halos de inibição (mm) obtidos na avaliação da atividade antifúngica do óleo volátil de *C. citratus* (OV) e de citral (SQR), submetidos à fotodegradação, por 16 dias, frente à cepa de *C. albicans* ATCC 10231.

Diâmetro dos halos de inibição (mm)*					
Amostras (2 µl)				Controles (20 µl)	
OV	SQR	OV 16 dias UV	SQR 16 dias UV	P	B
19,7	19,6	12,4	10,8	19,6	R

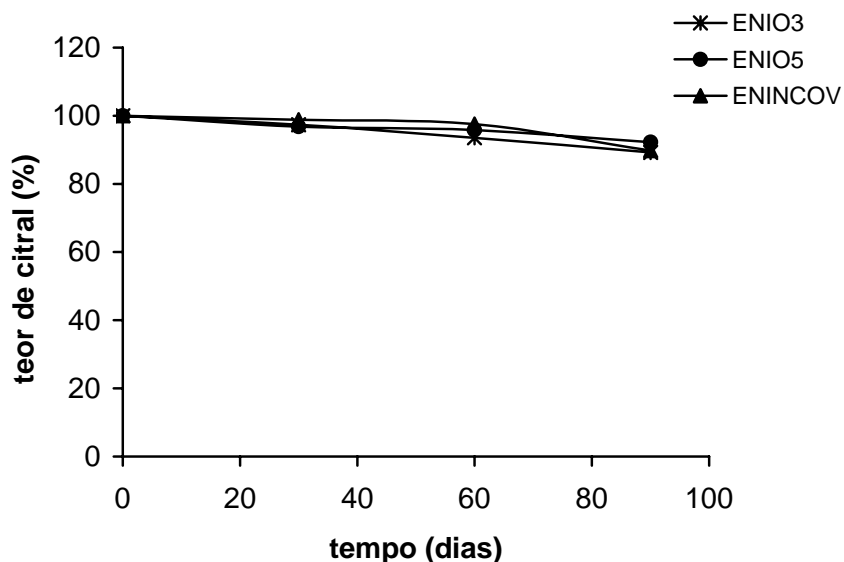
\*: média de seis determinações; P = solução nistatina (0,3 mg/ml); B = branco; R = resistente

#### 4.2.6.3.2 Estabilidade das formulações

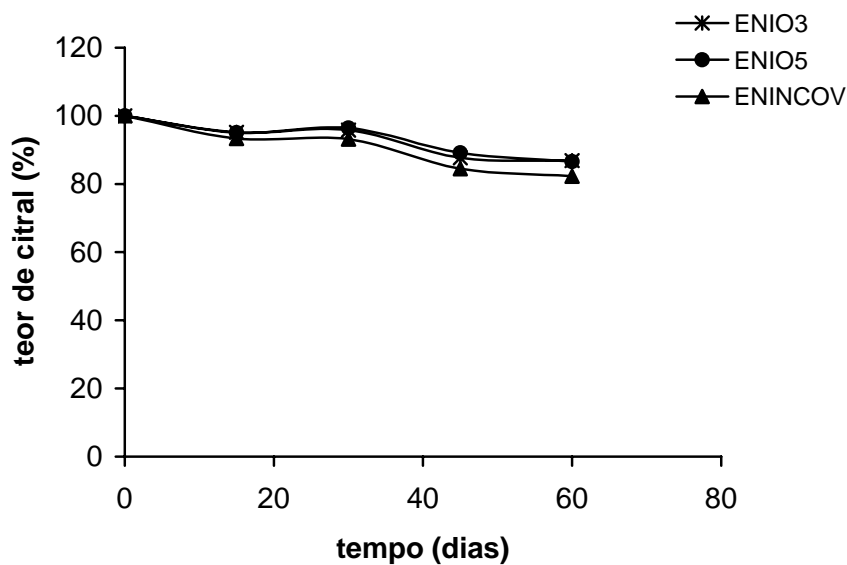
As Figuras 4.20, 4.21 e 4.22 ilustram o perfil de degradação térmica do citral obtido para as formulações ENIO3, ENIO5 e ENINC<sub>OV</sub>, submetidas as temperaturas de 7, 25 e 40 °C.



**FIGURA 4.20** – Representação gráfica da degradação térmica de citral em função do tempo, obtida a partir das amostras das formulações ENIO3, ENIO5 e ENINCOV armazenadas a 7 °C.



**FIGURA 4.21** – Representação gráfica da degradação térmica de citral em função do tempo, obtida a partir das amostras das formulações ENIO3, ENIO5 e ENINCOV armazenadas a 25 °C.



**FIGURA 4.22** – Representação gráfica da degradação térmica de citral em função do tempo, obtida a partir das amostras das formulações ENIO3, ENIO5 e ENINCOV armazenadas a 40 °C.

As Tabelas 4.34, 4.35 e 4.36 apresentam os resultados dos teores de citral nas formulações, obtidos a partir das amostras mantidas as temperaturas de 7, 25 e 40 °C.

**TABELA 4.34** – Teores de citral nas formulações ENIO3, ENIO5 E ENINC<sub>OV</sub> em função do tempo, obtidos a partir de amostras mantidas a 7 °C ± 2 °C.

Tempo (dias)	Teor (%)*		
	ENIO3	ENIO5	ENINC <sub>OV</sub>
0	100,00	100,00	100,00
30	96,63	97,53	99,82
60	97,59	97,56	98,91
90	97,54	97,57	100,52
120	98,82	98,41	99,48
150	96,89	96,63	99,90
180	97,05	96,96	99,03

\*: cada valor representa a média de duas determinações

**TABELA 4.35** – Teores de citral nas formulações ENIO3, ENIO5 E ENINC<sub>OV</sub> em função do tempo, obtidos a partir de amostras mantidas a 25 °C ± 2 °C.

Tempo (dias)	Teor (%)*		
	ENIO3	ENIO5	ENINC <sub>OV</sub>
0	100,00	100,00	100,00
30	97,32	96,80	98,78
60	93,49	95,78	97,57
90	89,20	92,28	89,78

\*: cada valor representa a média de duas determinações



**TABELA 4.36** – Teores de citral nas formulações ENIO3, ENIO5 E ENINC<sub>OV</sub> em função do tempo, obtidos a partir de amostras mantidas a 40 °C ± 2 °C.

Tempo (dias)	Teor (%)*		
	ENIO3	ENIO5	ENINC <sub>OV</sub>
0	100,00	100,00	100,00
15	95,18	95,09	93,32
30	95,76	96,43	93,15
45	87,67	89,12	84,50
60	86,85	86,58	82,30

\*: cada valor representa a média de duas determinações

Os valores de pH obtidos para as formulações em estudo, submetidas as temperaturas de 7, 25 e 40 °C, em diferentes períodos de armazenamento, encontram-se nas Tabelas 4.37, 4.38 e 4.39.

**TABELA 4.37** – Valores de pH obtidos para as amostras da formulação ENIO3, mantidas as temperaturas de 7, 25 e 40 °C.

Tempo (dias)	pH ± s*		
	7 °C	25 °C	40 °C
0	6,32	6,13 ± 0,07	6,32
15	-	-	5,25 ± 0,01
30	6,14 ± 0,03	5,66 ± 0,03	5,03 ± 0,02
45	-	-	4,61 ± 0,07
60	-	4,78 ± 0,07	4,41 ± 0,01
90	5,99 ± 0,09	4,77 ± 0,03	-
120	5,75 ± 0,01	-	-
150	5,86 ± 0,01	-	-
180	5,62	-	-

\*: cada valor representa a média de duas determinações

**TABELA 4.38** – Valores de pH obtidos para as amostras da formulação ENIO5 mantidas as temperaturas de 7, 25 e 40 °C.

Tempo (dias)	pH ± s*		
	7 °C	25 °C	40 °C
0	6,06 ± 0,01	5,78 ± 0,09	6,06 ± 0,01
15	-	-	5,18 ± 0,09
30	5,97 ± 0,01	5,34 ± 0,03	4,81 ± 0,01
45	-	-	4,43 ± 0,01
60	-	4,87 ± 0,04	4,19 ± 0,01
90	6,00 ± 0,06	4,44 ± 0,03	-
120	5,56 ± 0,04	-	-
150	5,50 ± 0,06	-	-
180	5,47 ± 0,03	-	-

\*: cada valor representa a média de duas determinações

**TABELA 4.39** – Valores de pH obtidos para as amostras da formulação ENINC<sub>OV</sub> mantidas as temperaturas de 7, 25 e 40 °C.

Tempo (dias)	pH ± s*		
	7 °C	25 °C	40 °C
0	6,05 ± 0,11	5,74 ± 0,05	5,92 ± 0,01
15	-	-	4,97 ± 0,02
30	5,87 ± 0,07	5,26 ± 0,01	4,55 ± 0,02
45	-	-	4,34 ± 0,10
60	-	5,33 ± 0,08	-
90	5,92 ± 0,03	4,20 ± 0,01	-
120	5,47 ± 0,07	-	-
150	5,38 ± 0,01	-	-
180	5,22 ± 0,02	-	-

\*: cada valor representa a média de duas determinações

#### 4.2.6.4 Discussão

O estudo preliminar da estabilidade fotoquímica do óleo volátil, particularmente, de seu principal componente, o citral, constituiu um aspecto importante deste trabalho, com o objetivo de avaliar a influência da luz UV sobre a amostra, fator de degradação, até o momento, não relatado para o óleo volátil, motivo pelo qual, foi realizado este ensaio. A quantificação de citral no óleo volátil foi realizada por CLAE, e a partir dos resultados obtidos foi possível estimar a cinética de degradação do citral, sob influência da luz UV, com espectro de emissão a 254 nm. Este ensaio não objetivou verificar a presença de produtos de degradação.

Os estudos preliminares de estabilidade objetivam fornecer informações rápidas sobre as possíveis alterações que uma substância pode sofrer, por ação da temperatura, luz e umidade (ICH, 1996b; NUDELMAN, 1975).

Os resultados obtidos demonstraram que, nos períodos de tempo avaliados, ocorreu a degradação de citral sob ação da luz UV 254 nm. Após 16 dias de exposição, o teor de citral no óleo volátil diminuiu, aproximadamente, 40%. Além disso, pequenas alterações na cor e no odor do óleo foram observadas. Para as amostras de citral (SQR) a degradação do mesmo mostrou-se mais acelerada em todos os tempos de exposição empregados. Verificou-se que após 10 e 12 dias de exposição, o teor de citral nestas amostras diminuiu cerca de 30% e 60%, respectivamente.

Conforme mencionado, uma das condições para que a reação fotoquímica ocorra é que a molécula apresente máximos de absorção na região do UV e a estrutura química da substância fornece algumas evidências sobre possíveis alterações que possam ocorrer com a mesma. A presença de ligações duplas na estrutura do citral permite sugerir que a luz poderia ser capaz de acelerar a degradação química desta substância. O citral, de acordo com os resultados obtidos neste trabalho, absorve no UV na região de, aproximadamente, 200 a 260 nm, com máximo de absorção em 233 nm, o que explicaria a sua instabilidade à luz UV 254 nm.

O estudo da estabilidade fotoquímica permitiu, também, elucidar a cinética da reação de fotodegradação do citral. A partir dos coeficientes de correlação obtidos para cada tratamento realizado ( $C$  versus  $t$ ,  $\log C$  versus  $t$  e  $1/C$  versus  $t$ ), foi possível verificar que a cinética de reação que melhor descreve a diminuição do teor de citral em função do tempo é a ordem zero (Tabelas 4.29 e 4.30). Assim, de acordo com o conceito de reação de ordem zero, a degradação de citral, sob a ação da luz com espectro de emissão em 254 nm, independe de sua concentração no óleo volátil.

As reações de degradação de substâncias ocorrem a velocidades definidas e após determinar a ordem de reação, pode-se calcular a constante de velocidade de degradação da reação ( $K$ ). Os valores de  $K$  para a fotodegradação do citral no óleo volátil, obtidos pelo método matemático e pela inclinação da reta, foram  $2,05 \text{ dias}^{-1}$  e  $2,26 \text{ dias}^{-1}$ , respectivamente; para o citral (SQR), os valores de  $K$ , pelo método matemático e pela inclinação da reta, foram  $3,25 \text{ dias}^{-1}$  e  $3,67 \text{ dias}^{-1}$ , respectivamente.

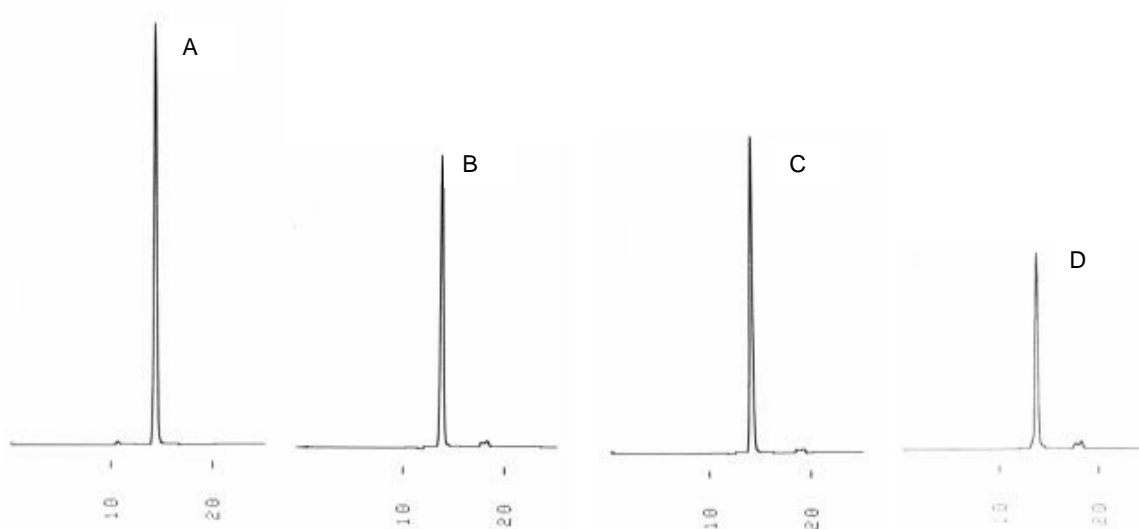
De posse dos resultados obtidos no estudo da fotodegradação foi possível verificar que a velocidade de degradação apresentada para o citral (SQR) é maior quando comparada com as amostras de óleo volátil. Após 10 dias de exposição observa-se um decaimento acentuado na concentração de citral quando empregado isoladamente; entretanto, nas amostras de óleo volátil, verifica-se uma diminuição gradual de sua concentração. O óleo volátil, por apresentar outros compostos em sua composição, confere ao citral uma melhor estabilidade, podendo esta estar relacionada, também, à degradação de outras substâncias presentes no mesmo, evitando, de certa forma, a degradação mais acelerada do citral.

No trabalho realizado por FREEBURG e colaboradores (1994), além da interferência da luz no processo de degradação do óleo volátil de limão, o pH das preparações contribuiu para a instabilidade do citral. A degradação de citral em bebidas e emulsões contendo o óleo de limão, armazenadas as temperaturas de 25, 35 e 45 °C, foi avaliada, e apresentou uma cinética de primeira ordem. Através destas observações

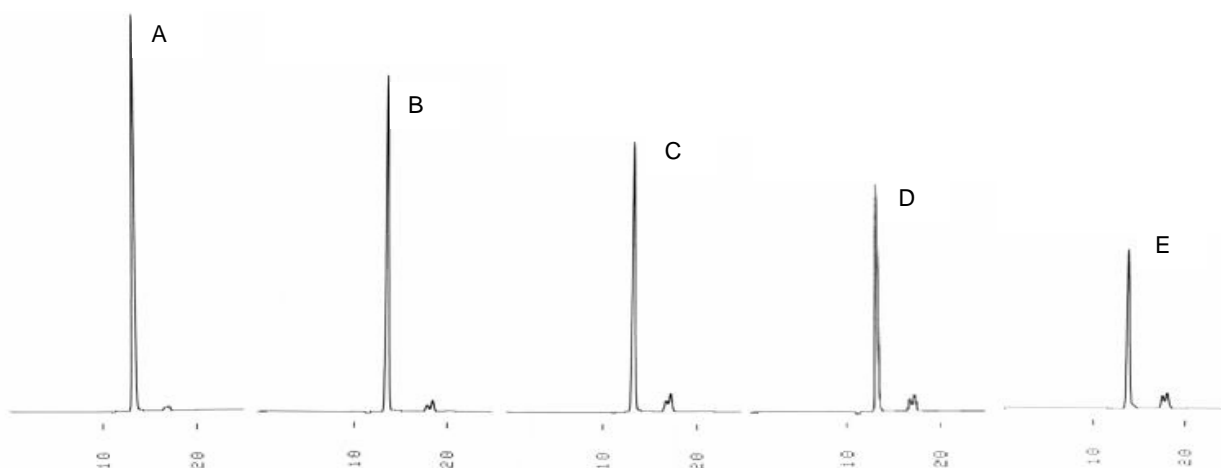
verifica-se que a cinética de reação de um produto ou substância depende do fator de decomposição empregado no estudo de estabilidade, bem como do tipo de preparação.

Além disso, nos estudos de estabilidade, é importante avaliar a ação farmacológica da amostra degradada ou dos produtos de degradação isolados, com o objetivo de verificar possíveis alterações que possam ocorrer no efeito apresentado pela substância. Neste trabalho, as amostras de óleo volátil e de citral, submetidas à fotodegradação, por 16 dias, foram avaliadas em relação à atividade antifúngica e os resultados obtidos demonstraram uma diminuição no halo de inibição frente à levedura de *C. albicans*, em comparação com as amostras não degradadas (Tabela 4.33); entretanto, o citral e o óleo volátil, mesmo em baixas concentrações, apresentaram ação inibitória, demonstrando, novamente, seu importante efeito.

A avaliação da estabilidade fotoquímica do óleo volátil possibilitou verificar o decaimento na concentração de citral em função do tempo e demonstrar seu perfil de degradação, não objetivando avaliar seus possíveis produtos de degradação; entretanto, é importante salientar que na análise dos cromatogramas obtidos das amostras degradadas de óleo volátil foi possível verificar a presença de dois novos picos, provavelmente, relacionados à formação de produtos de degradação do citral (Figura 4.23). Por outro lado, avaliando-se os cromatogramas obtidos para o citral (SQR) observa-se a presença destes picos na amostra não degradada (SQR) e nas amostras degradadas (Figura 4.24). De posse destes resultados, foi possível verificar um aumento na concentração destes produtos, decorrente da degradação do citral sob ação da luz UV (254 nm), e que, a presença dos mesmos na SQR pode estar relacionada ao processo de obtenção industrial do citral. Em relação ao método de quantificação empregado neste estudo, verifica-se que o mesmo mostrou-se adequado em determinar o teor de citral nas amostras submetidas à fotodegradação, possibilitando, também, verificar o surgimento de produtos de degradação.



**FIGURA 4.23** – Cromatogramas do citral, a 20  $\mu\text{g/ml}$ , para as amostras de óleo volátil submetidas à luz UV (254 nm): (A) óleo volátil; (B) amostra submetida por 8 dias; (C) amostra submetida por 12 dias; (D) amostra submetida por 16 dias. Condições cromatográficas: coluna Spherisorb 5CN<sup>®</sup> (250 mm x 4,6 mm, 5  $\mu\text{m}$ ) e pré-coluna Spherisorb 5CN<sup>®</sup> (10 mm x 4,6 mm, 5  $\mu\text{m}$ ); fase móvel *n*-hexano:etanol (85:15, v/v); fluxo 0,3 ml/min.; detecção 233 nm (1,0 AUFS).



**FIGURA 4.24** – Cromatogramas do citral, a 20  $\mu\text{g/ml}$ , para as amostras submetidas à luz UV (254 nm): (A) SQR; (B) amostra submetida por 4 dias; (C) amostra submetida por 8 dias; (D) amostra submetida por 10 dias; (E) amostra submetida por 16 dias. Condições cromatográficas: coluna Spherisorb 5CN<sup>®</sup> (250 mm x 4,6 mm, 5  $\mu\text{m}$ ) e pré-coluna Spherisorb 5CN<sup>®</sup> (10 mm x 4,6 mm, 5  $\mu\text{m}$ ); fase móvel *n*-hexano:etanol (85:15, v/v); fluxo 0,3 ml/min.; detecção 233 nm (1,0 AUFS).

Um dos objetivos dos estudos de estabilidade é determinar o período de tempo e sob quais condições a estabilidade do produto é satisfatória. A influência da temperatura nas formulações semi-sólidas ENIO3, ENIO5 E ENINC<sub>OV</sub> foi avaliada e os testes realizados objetivaram verificar, experimentalmente, o  $t_{90\%}$  das preparações, em diferentes temperaturas (7, 25 e 45 °C). A concentração de citral nas amostras foi determinada por CLAE, em diferentes períodos de armazenamento, até se obter uma perda de 10% em relação ao teor inicial.

Os resultados obtidos demonstraram que as formulações semi-sólidas foram estáveis a 7 °C, por um período de 180 dias. Para as formulações ENIO3 e ENIO5 obteve-se uma perda no teor inicial de citral de, aproximadamente, 3%; a formulação ENINC<sub>OV</sub> mostrou-se um pouco mais estável, apresentando uma diminuição de 1% na concentração inicial de citral (Tabela 4.34). Além disso, verificou-se que, às temperaturas de 25 e 40 °C, as formulações foram estáveis por 90 e 30 dias, respectivamente (Tabelas 4.35 e 4.36).

O estudo de estabilidade térmica das formulações permitiu verificar que o calor é um fator responsável pela degradação de citral no óleo volátil, verificada pela diminuição de sua concentração em função da temperatura de armazenamento. Além disso, o aumento da temperatura acelerou o processo de degradação do citral nas preparações. Estes resultados corroboram com os relatados na literatura, demonstrando a importância de se empregar baixas temperaturas na conservação de preparações contendo óleos voláteis (FREEBURG *et al.*, 1994).

Outro aspecto importante se refere ao pH das preparações. Foi verificado que nas temperaturas de 25 e 40 °C, a medida em que a concentração de citral diminuiu com o período de armazenamento, o valor de pH das amostras, também, diminuiu. De um modo geral, a perda de 10% na concentração de citral ocorreu abaixo de pH 4,7 para as formulações ENIO3 e ENIO5, e pH 4,5 para a formulação ENINC<sub>OV</sub>. Ainda, pode-se observar que, a baixas temperaturas, os valores de pH das formulações foram, também, alterados. O pH inicial das formulações foi em torno de 6,0 e, após 180 dias, a temperatura de 7 °C, as amostras apresentaram valores de pH inferiores (5,62; 5,47 e

5,22, para as formulações ENIO3, ENIO5 e ENINC<sub>OV</sub>, respectivamente) (Tabelas 4.37, 4.38 e 4.39); entretanto, esta alteração não afetou a estabilidade das formulações. Estes resultados, de um modo geral, evidenciam que maiores variações na concentração de citral ocorrem em valores de pH abaixo de 5,0, comprometendo, desta forma, a estabilidade das formulações semi-sólidas contendo o óleo volátil de *C. citratus*.

É importante salientar que para formas farmacêuticas de uso tópico, como cremes, pomadas, loções, soluções e géis, além dos testes recomendados para a avaliação dos fatores responsáveis pela degradação da substância ativa, outros aspectos contribuem para o estudo da estabilidade de tais preparações farmacêuticas. Os testes empregados estão relacionados com a aparência, cor, homogeneidade, odor, pH, consistência, distribuição do tamanho de partícula e potência da substância ativa, quando presente (NUDELMAN, 1975).

A análise macroscópica das formulações demonstrou que as amostras armazenadas durante seis meses, a temperatura de 7 °C, conservaram as suas características originais em relação à cor, odor e homogeneidade. Alterações visuais foram observadas em relação à cor e ao aspecto após 30 dias, a temperatura de 40 °C e 90 dias, a temperatura de 25 °C. As formulações apresentaram coloração levemente amarelada e aspecto menos consistente ao abrir as embalagens. Para a formulação ENINC<sub>OV</sub> observou-se, também, a formação de agregados quando armazenada a temperatura de 25 °C, após 90 dias. Desta forma, evidencia-se a importância de empregar determinações físico-químicas na avaliação da estabilidade de preparações farmacêuticas e que, a influência da temperatura, pode ocasionar alterações na aparência dos produtos, indicando uma possível degradação.

A degradação de substâncias nos óleos voláteis é complexa, pois são constituídos de um número variado de compostos. Em alguns casos, a atividade farmacológica apresentada pelo óleo volátil é devida a uma substância principal; entretanto, nas reações de degradação, outras substâncias poderão estar envolvidas.

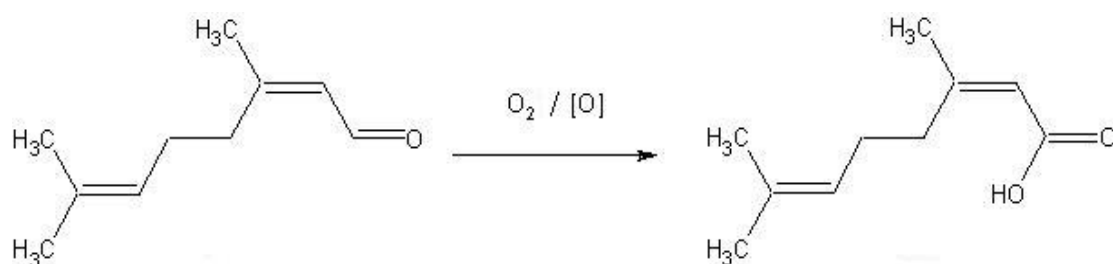


Neste trabalho, avaliou-se a estabilidade do óleo volátil e deste em formulações semi-sólidas pela determinação do teor de citral, verificando alterações na sua concentração em função tempo de armazenamento, sob ação da luz e da temperatura.

No processo de degradação do citral, sob influência da luz e da temperatura, diversas reações químicas podem estar envolvidas, como oxidação, isomerização e polimerização, e o mecanismo de reação que envolve estes processos é complexo. Contudo, algumas observações podem ser relatadas.

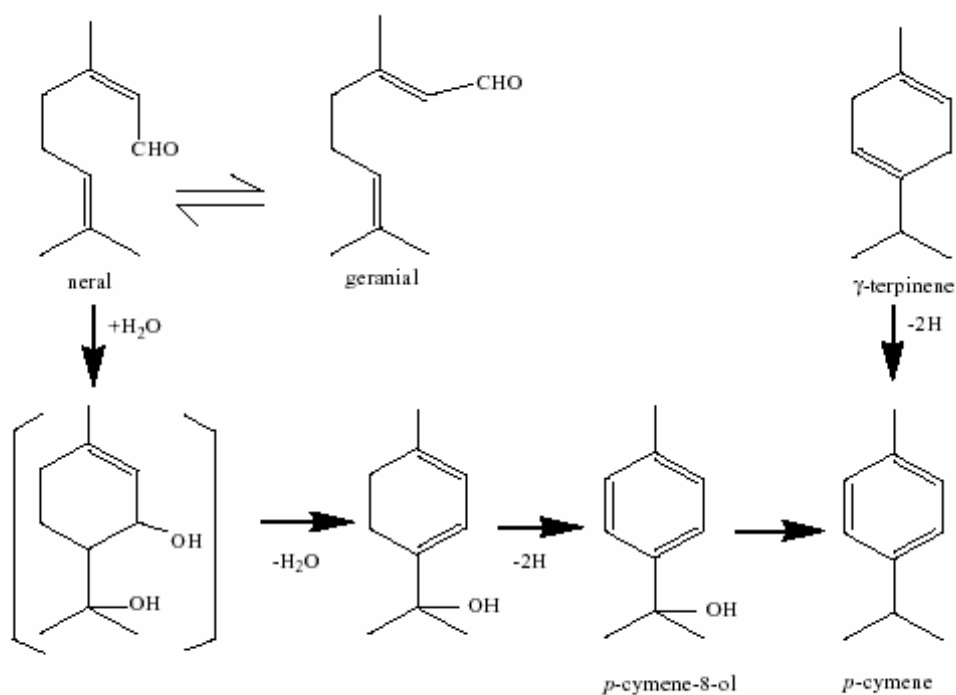
Os aldeídos são compostos facilmente oxidados, e a luz e o calor podem acelerar sua oxidação. A oxidação do citral, mediada por radicais livres ou pelo oxigênio molecular, pode levar à formação de um ácido carboxílico (Figura 4.25). Além disso, por apresentar em sua estrutura ligações duplas e hidrogênio- $\alpha$ , o processo de oxidação pode desencadear reações, levando à formação de peróxidos, por exemplo (GALIËN, 2003).

A formação destes produtos pode estar relacionada à diminuição do pH das formulações.



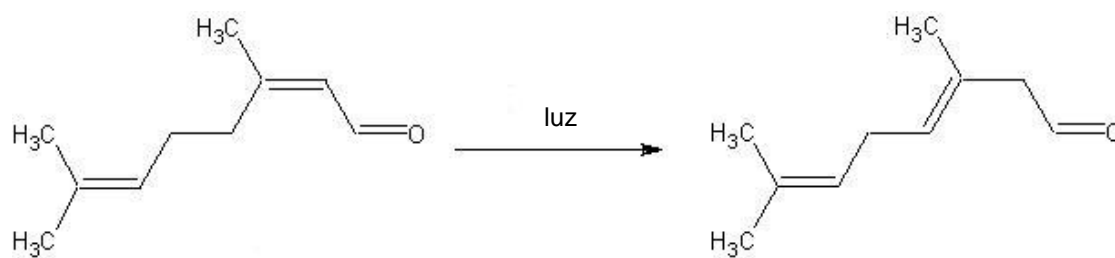
**FIGURA 4.25** – Oxidação do citral (GALIËN, 2003).

Conforme relatado, o *p*-cimeno é um produto de degradação térmica do citral, decorrente de sua oxidação-redução. O mecanismo de conversão do citral e  $\alpha$ -terpineno em *p*-cimeno foi proposto por SAWAMURA (2004) (Figura 4.26).



**FIGURA 4.26** – Mecanismo de conversão de citral e  $\gamma$ -terpineno em *p*-cimeno.

Por sua vez, a isomerização do citral, influenciada pelo calor, luz ou pH, foi proposta por GALIËN (2003) (Figura 4.27).



**FIGURA 4.27** – Isomerização do citral (GALIËN, 2003).

A formação de produtos de degradação do citral contribui para alterações no odor e na cor do óleo volátil e, conseqüentemente, das formulações. Além disso, a exposição do óleo volátil à luz e à temperatura, provavelmente, ocasionou a degradação de outros componentes presentes no óleo, bem como possíveis interações entre eles. Neste sentido, diferentes produtos podem ser obtidos.

Da mesma forma, diversas reações e produtos de degradação podem ser obtidos quando se emprega o óleo volátil, isoladamente, ou em preparações farmacêuticas. Na avaliação da estabilidade de uma emulsão contendo citral (em substituição ao óleo de limão), os produtos de degradação identificados foram: *p*-menta-1,5-dien-8-ol, *p*-menta-1(7),2-dien-8-ol,  $\alpha$ ,*p*-dimetilestireno, *p*-cimen-8-ol e 2,3-diidro-1,8-cineol. Estes compostos foram encontrados em pequenas quantidades (traços) nas bebidas e emulsões contendo o óleo volátil, as quais apresentaram como principal produto de degradação o *p*-cimeno (FREEBURG *et al.*, 1994). Estes resultados corroboram com os obtidos neste trabalho, demonstrando a importância de se avaliar substâncias ativas e em preparações, e evidenciam que outros compostos ou excipientes empregados na preparação de formulações influenciam na estabilidade da substância.

#### 4.2.7 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIFÚNGICA *IN VIVO*: estudo preliminar pré-clínico (BEM-JOSEF, *et al.*, 2003; TATSUMI *et al.*, 2001; VAN CUTSEN, 1989)

Com o objetivo de avaliar a eficácia da formulação ENIO5, um estudo preliminar pré-clínico foi realizado. Neste estudo empregaram-se cobaias albinas Hartley (ANILAB Animais de Laboratório Criação e Comércio Ltda, Paulínia, São Paulo), pesando de 200 a 300 g, mantidas sob condições padronizadas de temperatura ( $22 \pm 1$  °C) e umidade relativa do ar ( $85\% \pm 1\%$ ), em ciclos de claro e escuro de 12 horas. Os animais tiveram livre acesso à alimentação (*pellets*) e água, e foram utilizados após quatro dias de adaptação no biotério.

As infecções foram produzidas empregando-se cepa patogênica de *C. albicans* (IC de cobaia), mantida em ágar Sabouraud-dextrose (tubo inclinado). A suspensão do microrganismo foi preparada no momento do ensaio, em solução salina estéril, a uma concentração de, aproximadamente,  $10^6$  células/ml.

A região dorsal dos animais foi tricotomizada (área de, aproximadamente,  $3,5 \text{ cm}^2$ ), com auxílio de tricotomizador elétrico (Oster GOLDEN A5<sup>®</sup>, USA). Após a retirada do pêlo, a pele foi escarificada, e aplicou-se, a seguir, 100  $\mu\text{l}$  da suspensão da levedura, através de massagens suaves, cobrindo-se o local com parafilme e gaze estéril, fixando o curativo com fita adesiva hipoalergênica. O curativo oclusivo foi removido três dias após a promoção da infecção. Exames macroscópicos das lesões e reações produzidas na pele dos animais (eritema, descamação e crostas) foram realizados.

Após a confirmação da infecção, os animais foram, então, tratados com as amostras, e divididos em quatro grupos:

- **Grupo 1:** formulação ENIO5 (5 animais);
- **Grupo 2:** controle positivo (NIST) – creme comercial contendo nistatina (Micostalab<sup>®</sup> 100.000 UI/4g - Multilab, 4 animais);

- **Grupo 3:** controle negativo – formulação base ENI (3 animais);
- **Grupo 4:** branco (B), não tratado (2 animais).

O tratamento consistiu na administração tópica diária de 0,2 g de cada formulação, durante cinco dias. Análises macroscópicas das regiões infectadas foram realizadas no 6º, 7º e 12º dias após a infecção, verificando-se o aspecto visual da pele (formação de crostas e eritema), bem como o crescimento dos pêlos.

Os animais, após a finalização dos experimentos, foram eutanasiados em câmara de CO<sub>2</sub> (Biotécnicas Comércio e Instalações Ltda, São Paulo, SP, Brasil). O material biológico foi acondicionado em embalagem plástica apropriada e conservado em freezer, à -20 °C até ser recolhido pelo Centro de Controle de Zoonoses da Prefeitura de Porto Alegre/RS.

Os ensaios foram realizados em concordância com o Comitê de Ética em Pesquisa da UFRGS (Anexo 10.11).

#### 4.2.7.1 Resultados e Discussão

O estudo preliminar pré-clínico realizado neste trabalho objetivou avaliar a eficácia da formulação ENIO5, utilizando o método descrito na literatura para a avaliação da atividade antifúngica *in vivo* de substâncias ou produtos (BEM-JOSEF, *et al.*, 2003; TATSUMI *et al.*, 2001; VAN CUTSEN, 1989). Nestes estudos é possível verificar a atividade biológica da amostra, através da administração tópica no local infectado com o microrganismo em estudo, e comparar com a substância de referência. As avaliações são realizadas pela observação macroscópica das lesões produzidas na pele dos animais, as quais são características de cada tipo de infecção, bem como análises microscópicas, verificando-se a presença ou não do agente patogênico, evidenciando-se, desta forma, a melhora ou cura da doença. A *C. albicans* é o microrganismo empregado para promover candidíase cutânea em cobaias, e é capaz de penetrar no extrato córneo e mudar, morfológicamente, da forma leveduriforme

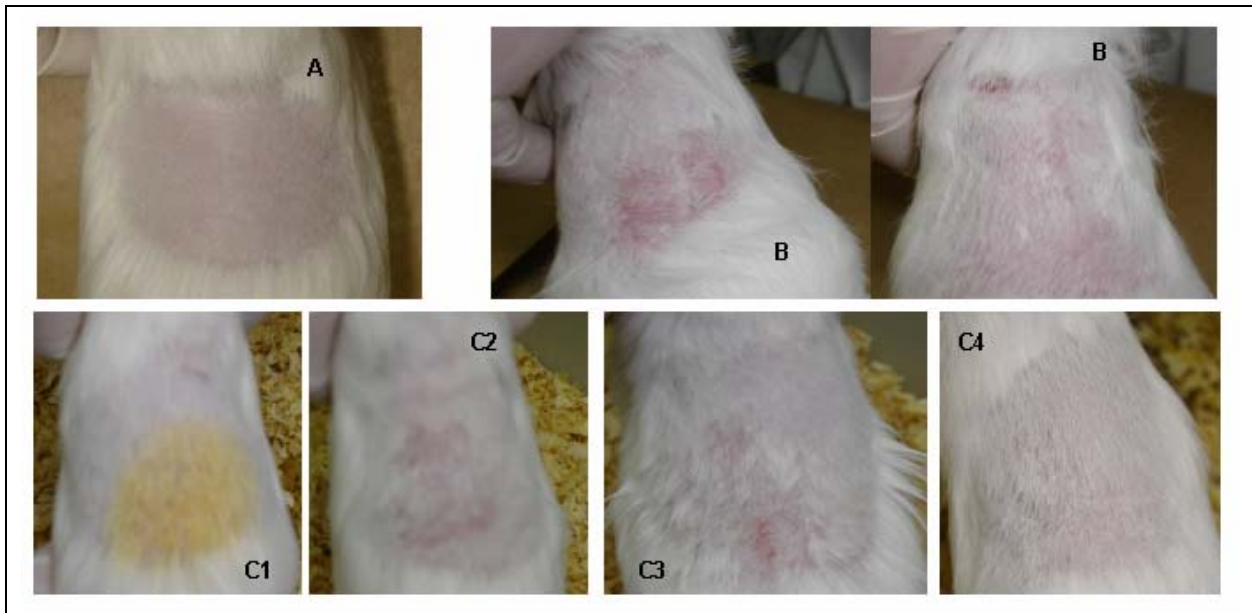
(forma saprofítica infectante) para pseudohifa (forma parasitária, micelial, isolada dos tecidos) (LACAZ *et al.*, 2002; VAN CUTSEN, 1989). Neste trabalho, as avaliações foram realizadas pela análise macroscópica dos locais infectados com *C. albicans*.

As lesões cutâneas produzidas pela *C. albicans* na pele escarificada de cobaias são caracterizadas pela formação de eritema, pústulas e crostas, causando desconforto, ardência e coceira no local afetado. Tais reações permanecem, geralmente, por 7 dias, e a cura espontânea é verificada após 10 a 12 dias (TORRES-RODRIGUEZ *et al.*, 1999; VAN CUTSEN, 1989).

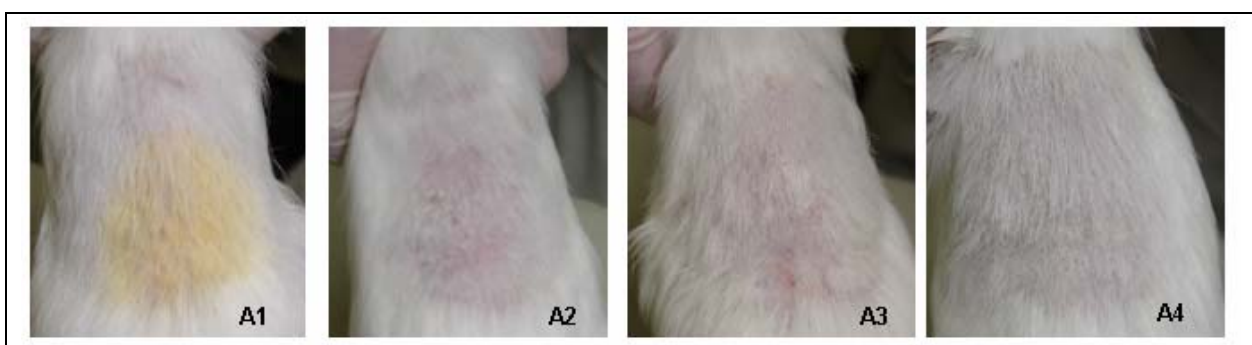
A análise visual das lesões produzidas na pele dos animais demonstrou a formação de eritema, cuja intensidade variou de vermelho a vermelho intenso, bem como a formação de pequenas crostas brancas, em todos os animais infectados. De posse destes resultados, verificou-se o quadro lesional produzido pela infecção e iniciou-se o tratamento tópico com as amostras em estudo.

Observações macroscópicas foram realizadas no 6º, 7º e 12º dias após a infecção. Durante o tratamento, observou-se que a infecção causou, em alguns animais, um importante desconforto, uma vez que alguns morderam a região infectada; no 6º e 7º dias após a infecção, verificou-se a permanência de crostas brancas na pele e pêlo dos animais, sendo que a visualização de eritema foi um pouco dificultada, em virtude do crescimento do pêlo no local infectado. Além disso, os animais tratados com a formulação contendo o óleo volátil (ENIO5) apresentaram uma coloração amarela nos pêlos, decorrente da administração do produto. No 12º dia após a infecção, verificou-se a presença de crostas brancas, em menores proporções e, após tricotomizar as regiões dos animais eutanasiados, foi possível verificar o aspecto da pele, evidenciando-se a ausência de eritema, exceto para um animal do grupo 2 (controle positivo), o qual apresentou a pele avermelhada. Durante a realização dos experimentos, um animal do grupo 3 (base ENI) foi descartado, pois encontrava-se debilitado, apresentando inchaço na região abdominal e apatia.

Os resultados obtidos na avaliação macroscópica das lesões produzidas na pele dos animais podem ser visualizados nas Figuras 4.28 e 4.29.



**FIGURA 4.28** – Fotomicrografias de candidíase cutânea em cobaias. (A) pele tricotomizada, antes da infecção; (B) pele infectada após oclusão (formação de eritema e crostas); (C) lesões – 7<sup>o</sup> dia após a infecção; (C1) tratamento com a formulação ENIO5; (C2) tratamento com controle positivo – NIST; (C3) tratamento com controle negativo – ENI; (C4) animal não tratado – B.



**FIGURA 4.29** – Fotomicrografias de candidíase cutânea em cobaias – 12<sup>o</sup> dia após a infecção. (A1) tratamento com a formulação ENIO5; (A2) tratamento com controle positivo – NIST; (A3) tratamento com controle negativo – ENI; (A4) animal não tratado – B.

Dentre as observações constatadas durante a realização dos experimentos, o crescimento dos pêlos na região infectada foi o aspecto mais evidenciado, visualmente (Figuras 4.28 e 4.29). Assim, a medida do crescimento do pêlo foi utilizada como critério de avaliação, uma vez que diferenças visuais foram observadas entre os diferentes tratamentos. Esta análise foi realizada medindo-se o comprimento dos pêlos (n = 10) após a eutanásia dos animais. Os resultados obtidos encontram-se na Tabela 4.40 e na Figura 4.30.

É importante salientar que dermatomicoses no couro cabeludo são caracterizadas, em alguns casos, por reações inflamatórias intensas e alopecia (HAINER, 2003; LACAZ *et al.*, 2002; LAUBE, 2004; SEVERO; LONDERO, 1996).

**TABELA 4.40** – Comprimento dos pêlos (mm), retirados das regiões no 12º dia após a infecção (n=10).

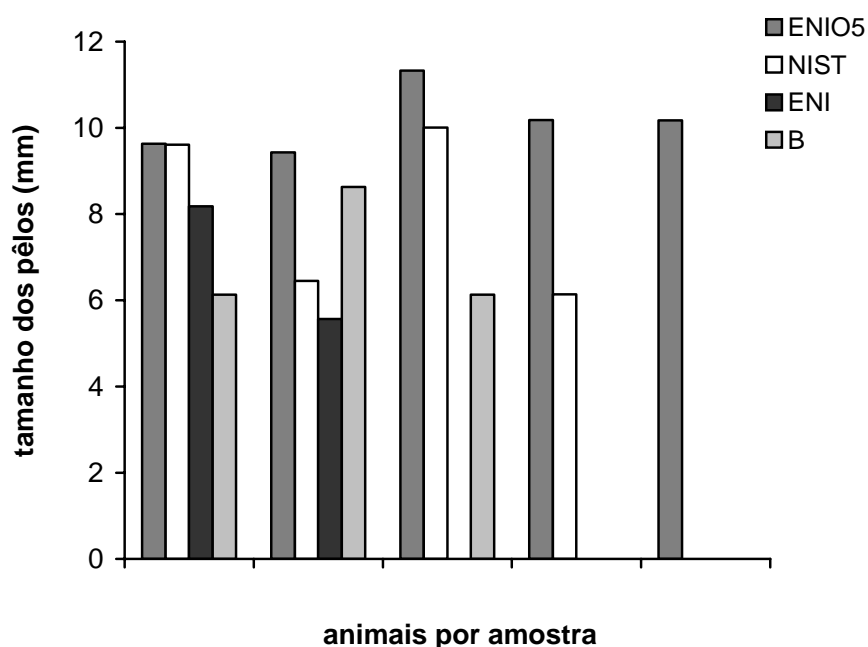
Animais	Comprimento dos pêlos* (mm) ± s			
	Grupo 1 (ENIO)	Grupo 2 (nistatina)	Grupo 3 (ENI)	Grupo 4 (não tratado)
1	9,63 ± 0,30	9,61 ± 0,90	8,18 ± 1,08	6,13 ± 0,81
2	9,43 ± 0,67	6,45 ± 1,83	5,57 ± 0,75	6,13 ± 2,04
3	11,33 ± 0,47	10,01 ± 0,81	-	8,63 ± 0,81
4	10,18 ± 0,76	6,14 ± 1,84	-	-
5	10,17 ± 0,80	-	-	-

\*: cada valor corresponde à média de 10 determinações

De posse dos resultados obtidos verificou-se que os animais tratados com a formulação ENIO5 apresentaram um crescimento maior e homogêneo dos pêlos, em comparação com as demais formulações. Além disso, menor variação entre os animais foi, também, observada. Nos animais tratados com a formulação contendo nistatina



observou-se uma maior variação no tamanho dos pêlos (6 a 10 mm); diferenças entre os animais não tratados e àqueles tratados com a base ENI não foram observadas. Estas evidências podem estar relacionadas com a umidade proporcionada pela aplicação da base ENI no local infectado, uma vez que constitui um dos fatores importantes para o crescimento e a incidência de infecções fúngicas na pele (Tabela 4.40 e Figura 4.30).



**FIGURA 4.30** – Comparação da medida do tamanho dos pêlos (mm) entre as formulações utilizadas no tratamento tópico de candidíase cutânea em cobaias, realizada no 12º dia após a infecção (n=10): tratamento com a formulação contendo o óleo volátil – ENIO5; tratamento com controle positivo – NIST; tratamento com controle negativo – ENI; animal não tratado – B.

O método utilizado neste trabalho para induzir candidíase cutânea na pele de cobaias mostrou-se adequado para a avaliação antifúngica *in vivo*, proporcionando um quadro lesional característico em todos os animais, além de permitir a observação das lesões produzidas, no decorrer de todo o experimento; entretanto, para se obter resultados conclusivos em relação à melhora ou cura das infecções, novos ensaios deverão ser realizados, com um maior número de animais e empregando-se análises microscópicas dos locais infectados, para verificar a presença ou não de *Candida*, especialmente, pseudohifas.

Contudo, com base nos resultados obtidos foi possível verificar que a formulação contendo o óleo volátil foi capaz de proporcionar um crescimento uniforme e mais acelerado dos pêlos, em comparação com as demais formulações.

---

## 5 DISCUSSÃO GERAL



O controle de qualidade de matérias-primas e preparações farmacêuticas tem como objetivos avaliar as características das substâncias, segundo normas e procedimentos estabelecidos por compêndios oficiais, buscando garantir a eficácia e segurança do produto. Neste sentido, diversas metodologias são empregadas e aplicadas desde a fase de desenvolvimento dos produtos até a obtenção da forma farmacêutica final.

A primeira etapa de avaliação deste trabalho constituiu na análise da matéria-prima vegetal, um óleo volátil, extraído das folhas do *C. citratus* (capim-cidró). Para tal, a análise de sua composição química foi avaliada por CG, determinando-se, principalmente, a concentração de seu principal componente, o citral (neral e geranial). Os resultados obtidos demonstraram que a amostra comercial de óleo volátil apresentou um teor de citral de 76%, em concordância com a faixa de concentração determinada (70 a 80%).

Este critério de avaliação deve-se ao fato de que o citral é o principal componente do óleo volátil responsável por sua atividade antimicrobiana, conforme relatado em alguns trabalhos (ABE *et al.*, 2003; INOUE, 2003; ONAWUNMI *et al.*, 1984; ONAWUNMI, 1989).

Além disso, procedeu-se a avaliação da atividade antifúngica do óleo volátil e do citral, atividade farmacológica de interesse deste estudo, empregando-se diversas cepas de *Candida* spp., em especial, *C. albicans*. A atividade antifúngica frente a esta espécie já havia sido comprovada em estudos anteriores (SCHUCK *et al.*, 2001); entretanto, novas espécies foram empregadas com o objetivo de ampliar seu espectro de ação.

Os resultados obtidos comprovaram a acentuada atividade antifúngica apresentada pelo óleo volátil, bem como de seu principal componente. Além disso, tais análises comprovam que esta ação antifúngica deve-se, principalmente, ao citral.

Face a estas observações e aos resultados descritos na literatura em relação ao potencial antimicrobiano apresentado pelo óleo volátil, percebe-se a

importância de desenvolver preparações farmacêuticas contendo este óleo, na busca de um tratamento alternativo de algumas doenças, em especial, candidíases superficiais e dermatomicoses.

Neste sentido, procurou-se desenvolver formulações semi-sólidas de uso tópico, as quais possibilitaram a incorporação do óleo volátil, em diferentes concentrações. Dentre as vantagens apresentadas por estas preparações pode-se citar: o seu baixo custo, uma vez que o óleo volátil é largamente produzido, especialmente para a obtenção de citral, e a planta é amplamente distribuída no Brasil, de fácil cultivo e obtenção. Além disso, as preparações farmacêuticas foram preparadas com excipientes usualmente utilizados em bases dermatológicas, de fácil aquisição e de baixo custo, empregando técnicas de manipulação simples, de fácil transposição para a escala industrial.

Ainda, sob o ponto de vista sócio-econômico, as pesquisas na área farmacêutica, buscando o desenvolvimento de medicamentos de origem vegetal para o tratamento de doenças, são fundamentais, principalmente em países em que uma parcela significativa da população tem pouco acesso aos medicamentos, muitas vezes, em função de seu alto custo. Especificamente, o tratamento de micoses superficiais, em alguns casos, é bastante oneroso para alguns pacientes, e a utilização de um produto fitoterápico, de menor custo, poderá auxiliar em determinados quadros patológicos, desde que comprovadas sua qualidade e eficácia.

Assim, formulações semi-sólidas foram desenvolvidas (emulsões e géis) e avaliadas em relação a suas propriedades físico-químicas e atividade antifúngica *in vitro*. De posse dos resultados obtidos, verificou-se que as formulações são potencialmente indicadas para o tratamento de micoses superficiais, apresentando atividade antifúngica *in vitro* contra fungos dermatófitos e a levedura de *C. albicans*, destacando os géis (GHO e GLO); entretanto, a formulação GLO, não apresentou características farmacotécnicas adequadas para o seu desenvolvimento.

O desenvolvimento tecnológico das formulações desenvolvidas neste trabalho, bem como aquelas propostas por RAUBER (2001), propiciou o depósito de patente junto ao Instituto Nacional de Propriedade Intelectual (INPI – BR 200203521-A).

Para assegurar a qualidade de preparações farmacêuticas contendo substâncias ativas, além de avaliar suas propriedades físico-químicas, é necessário quantificá-las, através de metodologia analítica específica. Após estabelecer o método analítico a ser empregado, foi necessário validá-lo, segundo diretrizes preconizadas por órgãos oficiais (ICH, 1996a; USP 28, 2005). Esta etapa do trabalho possibilitou selecionar as emulsões (ENIO3, ENIO5 e ENINC<sub>OV</sub>) para serem avaliadas nas subseqüentes análises, uma vez que a formulação GHO, apesar de apresentar melhor atividade antifúngica nos estudos *in vitro*, não se adequava às condições experimentais analíticas estabelecidas. Em virtude desta característica empregou-se a base não-iônica para a incorporação da suspensão de NC (formulação ENINC<sub>OV</sub>). Além disso, em função da concentração de óleo volátil presente nesta formulação (aproximadamente, 3%), empregou-se, a fim de comparação, a formulação ENIO3, de concentração semelhante.

Dentre os procedimentos necessários para a obtenção de um medicamento fitoterápico, é importante empregar metodologia analítica, devidamente validada, para a quantificação da(s) substância(s) ativa(s) vegetal(ais) e/ou marcadores, característicos da espécie (BRASIL, 2003).

A atividade farmacológica apresentada pelos óleos voláteis, muitas vezes, é devida ao sinergismo existente entre alguns compostos. Para o óleo volátil de *C. citratus*, o citral foi a substância ativa selecionada para a sua avaliação quantitativa, bem como nas formulações semi-sólidas desenvolvidas, em virtude de seu alto teor no óleo volátil e sua importância na atividade antimicrobiana apresentada pelo mesmo.

Neste trabalho, um método analítico por CLAE foi desenvolvido e validado, constituindo uma técnica alternativa para a quantificação de citral no óleo volátil e nas emulsões semi-sólidas, tendo em vista que a análise do óleo volátil é realizada por CG.

Além disso, em virtude da versatilidade da CLAE, o método proposto possibilita a quantificação do óleo volátil em laboratórios de controle de qualidade que não empregam a CG em suas análises. Outro aspecto importante se refere à escassez de dados na literatura a respeito de metodologia de controle de qualidade para preparações farmacêuticas contendo óleos voláteis, tão pouco à estabilidade de seus principais compostos.

O método analítico mostrou-se linear, preciso e exato. Além disso, pôde ser empregado nos estudos de estabilidade realizados para o óleo volátil e para as formulações semi-sólidas (RAUBER *et al.*, 2005).

Os resultados obtidos na quantificação de citral no óleo volátil por CLAE foram comparados com as análises por CG, a fim de verificar a concordância entre eles. As amostras comerciais de óleo volátil apresentaram um teor de citral de 75 e 77,6 %, quando analisadas por CLAE, e de 76 e 78,5%, por CG. Desta forma, observa-se que os valores encontrados foram semelhantes, indicando que o método analítico desenvolvido foi capaz de quantificar a substância ativa no óleo volátil, em concordância com a metodologia preconizada pelos códigos oficiais.

Em relação aos limites percentuais de citral obtidos para as formulações semi-sólidas, verificou-se que os valores encontram-se na faixa de 104 a 106%, 101 a 105% e 100 a 103%, do valor declarado, para as formulações ENIO3, ENIO5 e ENINC<sub>OV</sub>, respectivamente. Os limites preconizados pelas farmacopéias para a determinação do teor de fármacos em formas farmacêuticas compreendem de 90 a 110% (F. Bras. IV, 1988; USP 28, 2005).

Um outro aspecto importante a ser abordado no desenvolvimento de produtos farmacêuticos se refere à segurança apresentada pela preparação, ou de seus constituintes, quando utilizada pelo paciente. Com o objetivo de avaliar a segurança ou o grau de risco apresentado por um produto ou substância, ensaios toxicológicos *in vivo* e *in vitro* são descritos (BRASIL, 2003a; FDA, 2004; INCQS, 2002; OECD, 2002).



De acordo com Resolução – RE nº 90 da ANVISA, um dos testes preconizados para os produtos fitoterápicos de uso tópico, compreende o ensaio de irritação cutânea.

Neste trabalho, a avaliação do potencial de irritação cutânea das formulações ENIO3, ENIO5 e ENINC<sub>OV</sub> foi verificada pelo teste de irritação primária da pele, em coelhos. Adicionalmente, o teste *in vitro* de citotoxicidade foi, também, realizado, a fim de avaliar o efeito citotóxico provocado pelo óleo volátil nas culturas celulares, e comparar os dois métodos de avaliação.

As formulações contendo o óleo volátil foram classificadas como ligeiramente irritantes nos ensaios *in vivo*. A irritação provocada pelas formulações na pele dos animais é pressuposta, especialmente por se tratar de um produto contendo um óleo volátil com elevado teor de citral; entretanto, os resultados obtidos foram satisfatórios, uma vez que o risco apresentado pelos produtos é baixo. Além disso, o teste em animais é, atualmente, a metodologia preconizada para a avaliação do potencial irritante de produtos, uma vez que, até o momento, métodos alternativos não foram validados; contudo, os testes *in vitro* constituem uma ferramenta importante no desenvolvimento de novos medicamentos, em especial, na seleção de substâncias ou produtos não irritantes. Nos ensaios *in vitro* realizados pôde-se verificar uma maior sensibilidade apresentada pelas culturas celulares, em comparação ao modelo *in vivo*, além de diferenças entre as preparações, no que se refere à concentração de óleo volátil e excipientes empregados.

No desenvolvimento de preparações farmacêuticas, outro ponto importante a ser avaliado se refere à estabilidade dos produtos (LACKMAN *et al.*, 2001; NUDELMAN, 1975). Devido à variabilidade química das substâncias presentes nos óleos, bem como a sua instabilidade, torna-se necessário verificar a influência de determinados fatores ambientais (luz, temperatura, entre outros) na estabilidade de produtos contendo tais substâncias, além de definir as condições ideais de conservação e armazenamento. Neste sentido, realizou-se o estudo da estabilidade das formulações semi-sólidas contendo o óleo volátil (ENIO3, ENIO5 e ENINC<sub>OV</sub>).

De acordo com os resultados obtidos, as formulações contendo o óleo volátil de *C. citratus* devem ser conservadas em baixas temperaturas ( $7\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ ), a fim de evitar a degradação de citral ou de outros componentes presentes no óleo, além de preservar suas características organolépticas (cor e odor) e homogeneidade. As formulações mantiveram-se estáveis por 180 dias, sob tais condições.

Empregando-se condições especificadas pelos guias (BRASIL, 2005; ICH, 2003a; ICH 2003b), não foi possível estimar o prazo de validade das formulações, uma vez que as temperaturas de  $40\text{ }^{\circ}\text{C}$  e  $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ , as preparações mostraram-se instáveis. Conforme relatado, o prazo de validade de 24 meses é concedido para produtos estáveis a temperatura de  $40\text{ }^{\circ}\text{C}$  (75% UR), por 6 meses e a  $25\text{ }^{\circ}\text{C}$  (60% UR), por 12 meses (produtos semi-sólidos). O prazo de validade das formulações poderia ser estimado através do teste de longa duração, conduzido a temperatura de  $5\text{ }^{\circ}\text{C}$ , durante 12 ou 24 meses.

No que se refere à estabilidade, um outro aspecto abordado consistiu em avaliar a influência da radiação UV na estabilidade do óleo volátil, especificamente, do citral. Neste estudo, verificou-se que o citral apresenta menor velocidade de degradação nas amostras de óleo volátil, em comparação com a substância isolada (SQR), demonstrando que a presença de outros componentes no óleo favorece a estabilidade do citral, protegendo-o, de certa forma, de fatores externos. Estas observações demonstram a importância de se empregar o óleo volátil na preparação de formas farmacêuticas, em substituição ao citral, uma vez que apresenta atividade antifúngica semelhante ao citral e melhor estabilidade. Além disso, a utilização de citral poderá comprometer a segurança do produto, conforme preconizado pela IFRA e em concordância com os relatos existentes da literatura em relação ao efeito sensibilizante apresentado para esta substância (ALLENBY *et al.*, 1993; BASKETTER; SCHOLE, 1992; BASKETTER *et al.*, 1994; FROSCH *et al.*, 1995). O óleo volátil demonstrou vantagens em relação ao citral, no que se refere à ação antifúngica, toxicidade e estabilidade.

Buscando empregar a nanotecnologia e suas aplicações na obtenção de uma forma farmacêutica semi-sólida mais estável, protegendo o óleo volátil de possíveis degradações, ou, ainda, diminuir a sua volatilização, o mesmo foi incorporado em suspensões de NC de Eudragit S100<sup>®</sup>. A suspensão de NC foi, então, incorporada em uma base não-iônica (formulação ENINC<sub>OV</sub>).

No que se refere à estabilidade, a formulação ENINC<sub>OV</sub> apresentou o mesmo comportamento que as formulações ENIO3 e ENIO5. O efeito protetor esperado para o óleo volátil não foi evidenciado nos experimentos realizados a temperatura ambiente (25 °C) e a 40 °C. Sob tais condições, verificou-se uma queda mais acentuada no teor de citral, em comparação com as demais formulações (Tabelas 4.35 e 4.36); contudo, quando as amostras foram armazenadas em geladeira (7 °C), verificou-se uma menor diferença entre o teor de citral inicial e após 180 dias (Tabela 4.34). Estes resultados evidenciam a maior suscetibilidade da formulação ENINC<sub>OV</sub> ao calor; por outro lado, permitem prever um maior tempo de conservação em baixas temperaturas.

Um outro aspecto importante se refere aos testes de irritação cutânea realizados. No teste *in vitro*, a formulação ENINC<sub>OV</sub> apresentou menor efeito citotóxico, em comparação com a formulação ENIO3, de concentração semelhante. Assim, a incorporação do óleo volátil em NC foi capaz de diminuir sua toxicidade em relação às culturas celulares, e o grau de irritação apresentado foi igual ao encontrado no ensaio *in vivo* (ligeiramente irritante); entretanto, nos testes *in vivo* não se observou diferenças entre as formulações.

Face a essas observações, sob o aspecto econômico, a formulação ENINC<sub>OV</sub> não apresentou vantagens em relação às formulações ENIO3 e ENIO5, uma vez que diferenças importantes na avaliação da estabilidade e do potencial de irritação cutânea não foram evidenciadas; entretanto, foi possível verificar a viabilidade tecnológica da inclusão de óleos voláteis em nanopartículas e a incorporação de tais sistemas em bases semi-sólidas.

A fase final deste trabalho consistiu na avaliação preliminar da atividade antifúngica *in vivo* da formulação ENIO5. Os ensaios pré-clínicos fazem parte das diversas etapas necessárias para comprovar a eficácia de uma substância ou produto, além de correlacionar com os estudos realizados *in vitro* (VAN CUTSEN, 1989). Utilizando o modelo animal descrito para a avaliação *in vivo* de candidíase cutânea, foi possível verificar que a aplicação tópica da formulação ENIO5 resultou em uma melhora no quadro lesional produzido pela infecção, visualizado pelo aspecto da pele, especialmente, no que se refere ao crescimento dos pêlos, indicando uma resposta positiva em relação à melhora da infecção. Além disso, o modelo animal empregado mostrou-se adequado para esta avaliação, pois emprega animais dóceis e de fácil manipulação, além de serem suscetíveis à infecção causada pela *C. albicans*. Estes resultados servirão de base para novos ensaios pré-clínicos a serem realizados, utilizando um maior número de animais e avaliações microscópicas e histopatológicas dos locais infectados, evidenciando-se, com maior clareza, a eficácia das formulações preparadas com o óleo volátil de *C. citratus*.

---

## **6 CONCLUSÕES**



- A amostra comercial do óleo volátil de *C. citratus* apresentou um teor de citral (76%) dentro da especificação preconizada para a planta e compatível com o limite estipulado para a sua utilização nas formulações semi-sólidas desenvolvidas.
- Na avaliação da atividade antifúngica do óleo volátil e do citral verificou-se que ambos apresentam atividade para espécies de *C. albicans* (ATCC e IC) e para cepas não-*albicans* (*C. glabrata*, *C. krusei*, *C. parapsilosis* e *C. tropicalis*), demonstrando o seu amplo espectro de ação.
- O ensaio da atividade antifúngica frente à leveduras do gênero *Candida* corroborou com os relatos existentes na literatura, de que o citral é o principal componente do óleo volátil responsável por sua atividade antimicrobiana.
- Os resultados obtidos na caracterização físico-química das NC contendo óleo volátil de *C. citratus* foram satisfatórios e permitiram a sua utilização na elaboração de uma forma farmacêutica semi-sólida.
- As formulações ENIO3, ENIO5, ENINC<sub>OV</sub>, GHO e GLO apresentaram-se homogêneas em relação à cor, ao odor e ao aspecto, e valores de pH compatíveis com a aplicação destes produtos na pele.
- O teste de viscosidade demonstrou que as formulações apresentaram comportamento de fluxo não-newtoniano e permitiu selecionar as emulsões (ENIO3, ENIO5 e ENINC<sub>OV</sub>) e o gel hidrofílico (GHO) como as preparações mais adequadas.
- Os ensaios da atividade antifúngica *in vitro* das formulações demonstraram, igualmente, a potencialidade do óleo volátil em inibir o crescimento de fungos responsáveis por causar infecções em humanos e animais, em especial, frente aos fungos dermatófitos.
- A atividade antifúngica *in vitro* das formulações frente à levedura de *C. albicans* se relacionou com o tipo de base utilizada para a incorporação do óleo volátil e a

concentração do mesmo na formulação. As emulsões apresentaram menor atividade que os géis.

- Nos ensaios realizados com os fungos dermatófitos (*M. canis* e *T. rubrum*) foi possível verificar a maior atividade apresentada pelas formulações contendo o óleo volátil (ENIO3, ENIO5, GHO e GLO) em comparação com a formulação contendo cetoconazol (ENI<sub>CETO</sub>), fármaco empregado no tratamento de algumas micoses superficiais.
- O método de doseamento por CLAE, nas condições experimentais estabelecidas, mostrou-se linear, preciso, exato e específico, podendo ser utilizado para a determinação quantitativa de citral no óleo volátil de *C. citratus* e em emulsões semi-sólidas.
- As formulações semi-sólidas contendo o óleo volátil de *C. citratus* (ENIO1,5, ENIO3, ENIO5 e ENINC<sub>OV</sub>), em diferentes concentrações, foram classificadas como ligeiramente irritantes no ensaio de irritação cutânea.
- Comparando-se os resultados obtidos nos testes *in vivo* (em coelhos) e *in vitro* (em culturas celulares) verificou-se que a linhagem celular NCTC clone 929 apresentou uma maior sensibilidade.
- O teste *in vivo* para a avaliação da segurança biológica das formulações possibilitou explorar o seu potencial de irritação e verificar que os produtos desenvolvidos apresentam um ligeiro grau de irritação; entretanto, são factíveis para a aplicação clínica. Além disso, estes estudos constituem uma ferramenta valiosa no desenvolvimento de novos medicamentos.
- O estudo preliminar da estabilidade fotoquímica do óleo volátil demonstrou que o citral e o óleo volátil são sensíveis à irradiação da lâmpada germicida com emissão em 254 nm.



- Os resultados obtidos na avaliação da cinética de degradação indicam tratar-se de uma reação de ordem zero; a velocidade de degradação do citral no óleo volátil foi menor ( $2,05 \text{ dias}^{-1}$ ) em comparação com a amostra de citral (SQR) ( $3, 25 \text{ dias}^{-1}$ ).
- Através da CLAE foi possível verificar a diminuição do teor de citral nas amostras de óleo volátil e de citral (SQR) submetidas à fotodegradação.
- O estudo da estabilidade térmica das formulações contendo o óleo volátil (ENIO3, ENIO5 e ENINC<sub>OV</sub>) demonstrou que as formulações são estáveis a  $7 \text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2 \text{ }^{\circ}\text{C}$ , por 180 dias.
- O efeito do calor nas formulações (25 e 40  $^{\circ}\text{C}$ ) provocou a diminuição do teor de citral, do pH, bem como alterações na aparência das mesmas.
- Para manter a estabilidade física e química de formulações contendo o óleo volátil, recomenda-se conservá-las em baixas temperaturas (5 a 7  $^{\circ}\text{C}$ ), protegendo-as do calor e da luz.
- O modelo animal de candidíase cutânea mostrou-se adequado para a avaliação da atividade antifúngica *in vivo* das amostras em estudo. A análise macroscópica e a medida do crescimento dos pêlos foram os parâmetros de avaliação empregados.
- A formulação ENIO5 possibilitou um crescimento maior e homogêneo dos pêlos nos locais infectados com cepa patogênica de *C. albicans*, contribuindo para a melhora da infecção.



---

## **7 CONSIDERAÇÕES FINAIS**



A busca de substâncias com atividade farmacológica tem sido objeto de estudo de diversas pesquisas, buscando obter novos produtos que possam auxiliar no tratamento de doenças. Neste sentido, as plantas medicinais assumem papel relevante, principalmente, pela sua diversidade, por serem constituídas de substâncias de origem natural, além de apresentar importante ação terapêutica e usualmente empregadas na medicina popular.

O interesse em desenvolver preparações farmacêuticas com o óleo volátil de *C. citratus*, baseou-se nas suas propriedades antimicrobianas e no seu amplo espectro de ação, buscando obter um fitoterápico eficaz para o tratamento tópico de micoses superficiais, dentre elas, candidíases e dermatomicoses. Para tal, diversos ensaios foram delineados e realizados, incluindo etapas necessárias para o registro e comercialização dos produtos.

De um modo geral, as formulações desenvolvidas foram caracterizadas no que se refere as suas propriedades físico-químicas, atividade antifúngica, estabilidade e toxicidade dérmica, empregando-se técnicas adequadas de análise e controle de qualidade. Dentre os ensaios realizados, o desenvolvimento da técnica analítica para a quantificação de citral no óleo volátil, nas suspensões de NC e nas formulações semi-sólidas foi um dos testes mais importantes e de grande contribuição para este trabalho. As próximas etapas a serem avaliadas para a adequação dos produtos se relacionam aos ensaios pré-clínicos e clínicos, de maneira a comprovar a eficácia dos mesmos.

É importante salientar que no decorrer das pesquisas novas idéias podem surgir, ampliando as possibilidades de outros trabalhos e/ou ensaios que possam contribuir ou aprimorar os dados já existentes, bem como incluir novas preparações. Uma das potencialidades verificada foi a obtenção de um pó contendo o óleo volátil, obtido por secagem por aspersão. Esta nova proposição poderá contribuir na estabilização do óleo volátil e de seus componentes.

Ainda, foi possível verificar o efeito inibitório do óleo frente a *Fonsecaea pedrosoi*, um fungo dimórfico, responsável por causar cromoblastomicose em humanos,

cuja doença, se não detectada em seu estágio inicial, não apresenta tratamento terapêutico, sendo necessário a remoção cirúrgica ou enxerto cutâneo. Além disso, poucas substâncias apresentam atividade contra tal fungo. Este trabalho está sendo realizado em colaboração com a Profa. Dra. Maria L. Scroferneker, do Instituto de Ciências Básicas da Saúde, da UFRGS.

---

**8 PUBLICAÇÕES**

















---

**9 REFERÊNCIAS**





---

ABE, S.; SATO, Y.; INOUE, S.; ISHIBASHI, H.; MARUYAMA, N.; TAKIZAWA, T.; OSHIMA, H.; YAMAGUCHI, H. Anti-*Candida albicans* activity of essential oils including lemongrass (*Cymbopogon citratus*) oil and its component, citral. **Jpn. J. Med. Mycol**, Tokyo, v. 44, n. 4, 2003. (Resumo).

ABIFRA. Associação Brasileira das Indústrias de Óleos Essenciais, Produtos Químicos Aromáticos, Fragrâncias, Aromas e Afins. Disponível em: <<http://www.abifra.org.br/manual/index.html>>. Acesso em: 04.11.2004.

ADEGOKE, G.O.; ODESOLA, B.A. Storage of maize and cowpea and inhibition of microbial agents of biodeterioration using the powder and essential oil of lemon grass (*Cymbopogon citratus*). **Int. Biodeterior. Biodegrad**, Barking, p. 81-84, 1996.

AL SOGAIR, S. Fungal infection in children: tinea capitis. **Clin. Dermatol**, Philadelphia, v. 18, p. 679-685, 2000.

ALLENBY, C.F.; BASKETTER, D.A.; DICKENS, A.; BARNES, E.G.; BROUGH, H.C. An arm immersion model of compromised skin. **Contact Dermatitis**, Copenhagen, v. 28, p. 84-88, 1993.

ALVAREZ-ROMÁN, R.; BARRÉ, G.; GUY, R.H.; FESSI, H. Biodegradable polymer nanocapsules containing a sunscreen agent: preparation and photoprotection. **Eur. J. Pharm. Biopharma**, Stuttgart, v. 52, p. 191-195, 2001.

ALZAMORA, L.; MORALES, L.; ARMAS, L.; FERNÁNDEZ, G. Medicina tradicional en el Perú: actividad antimicrobiana *in vitro* de los aceites esenciales extraídos de algunas plantas aromáticas. **An. Fac. Med**, Lima, v. 62, n. 2, p. 156-161, 2001.

AMIRJAHED, A.R. Simplified method to study stability of pharmaceutical preparations. **J. Pharm. Sci**, Washington, v. 66, n. 7, p. 785-789, 1977.

ANAISSE, E.J.; GHANNOUM, M.; MARR, K.; PAPAS, P.G.; RINALDI, M.G.; SOBEL, J.D.; WALSH, T.J. **Human mycoses**. Disponível em: <[http://www.doctorfungus.org/mycoses/human/human\\_index.htm](http://www.doctorfungus.org/mycoses/human/human_index.htm)>. Acesso em: 05.11.2004.

ANDRIOLE, V.T. Current and future antifungal therapy: new targets for antifungal therapy. **Int. J. Antimicrob. Agents**, Amsterdam, v. 16, p. 317-321, 2000.

BARATTA, M.T.; DORMAN, H.J.D.; DEANS, S.G.; FIGUEIREDO, A.C.; BARROSO, J.G.; RUBERTO, G. Antimicrobial and antioxidant properties of some commercial essential oils. **Flavour Fragr. J**, Chichester, v. 13, p. 235-244, 1998.

BARD, M.; ALBRECHT, M.R.; GUPTA, N.; GUYNN, C.J.; STILLWELL, W. Geraniol interferes with membrane functions in strains of *Candida* and *Saccharomyces*. **Lipids**, Champaign, v. 23, n. 6, p. 534-538, 1988.

- BARRAT, G.M. Therapeutic applications of colloidal drug carriers. **Pharma. Sci. Technol. today**, Oxford, v. 3, n. 5, p. 163171, 2000.
- BASKETTER, D.A.; SCHOLEES, E.W. Comparison of the local node assay with the guinea pig maximization test for the detection of a range of contact allergens. **Food Chem. Toxicol**, Oxford, v. 30, n. 1, p. 65-69, 1992.
- BASKETTER, D.A.; SCHOLEES, E.W.; KIMBER, I. The performance of the local lymph node assay with chemicals identified as contact allergens in the human maximization test. **Food Chem. Toxicol**, Oxford, v. 32, n. 6, p. 543-547, 1994.
- BECK, R.C.R.; POHLMANN, A.R.; GUTERRES, S.S. Nanoparticle coated microparticles: preparation and characterization. **J. Microencapsul**, London, v. 21, n. 5, p. 499-512, 2004.
- BEN-JOSEF, A.M.; CUTRIGHT, J.L.; MANAVATHU, E.K.; SOBEL, J.D. CAN-296-P is effective against cutaneous candidiasis in guinea pigs. **Inter. J Antimicrob. Agents**, Amsterdam, v.22, p. 168-171, 2003.
- BENNIS, S.; CHAMI, F.; CHAMI, N.; BOUCHIKHI, T.; REMMAL, A. Surface alteration of *Saccharomyces cerevisiae* induced by thymol and eugenol. **Lett. Appl. Microbiol**, Oxford, v. 38, p. 454-458, 2004.
- BRASIL. Portaria nº 116, de 08 de agosto de 1996. Publica proposta de normas para estudo da toxicidade e da eficácia de produtos fitoterápicos. Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Brasília, DF, 12 ago.1996.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária – Guia para a avaliação de segurança de produtos cosméticos. Diário Oficial da República Federativa do Brasil. Brasília, DF, 2003a, 47 p.
- BRASIL. Resolução nº 899, de 29 de maio de 2003. Determina a publicação do “Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos”. Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Brasília, DF, 2003b.
- BRASIL. Resolução – RDC nº 48, de 16 de março de 2004. Dispõe sobre o registro de medicamentos fitoterápicos. Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Brasília, DF, 2004a.
- BRASIL. Resolução – RE nº 90, de 16 de março de 2004. Determina a publicação do “Guia para a realização de estudos de toxicidade pré-clínica de fitoterápicos”. Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Brasília, DF, 2004b.
- BRASIL. Resolução – RE nº 1, de 29 de julho de 2005. Determina a publicação do “Guia para a realização de estudos de estabilidade”. Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Brasília, DF, 2005.

---

BUCK, D.S.; NIDORF, D.M.; ADDINO, J.G. Comparison of two topical preparations for the treatment of onychomycosis: *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil and clotrimazole. **J. Fam. Pract**, New York, v. 38, n. 6, p. 601-604, 1994.

CALDERONE, R.A.; FONZI, W.A. Virulence factors of *Candida albicans*. **Trends Microbiol**, Cambridge, v. 9, n. 7, p. 327-335, 2001.

CARDOSO, S.G. Terbinafina: validação de metodologia de análise e estabilidade fotoquímica. 2000. 210 p. Tese (Doutorado) - Programa de Pós-Graduação Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2000.

CARDULLO, A.C.; RUSZKOWSKI, A.M.; DeLeo, V.A. Allergic contact dermatitis resulting from sensitivity to citrus peel, geraniol, and citral. **J. Am. Acad. Dermatol**, Saint. Louis, v. 21, n. 2, p. 395-397, 1989.

CARMO, C.M.F.; LIMA, E.O.; MILAN, E.P. Atividade antifúngica de extratos e óleos essenciais contra *Candida albicans* isolada de pacientes com AIDS. **Rev. Bras. Farm**, Rio de Janeiro, v. 79, n. 3/4, p. 108-111, 1998.

CHAN, K. Quantitation of monoterpenoid compounds with potential medicinal use in biological fluids. **J. Chromatogr A**, New York, v. 936, p. 47-57, 2001.

CHANFRAU, J.E.R.; FUENTES, L.; RUIZ, Z.P.; GARMA, M. Estabilidad de extractos fluidos al 70% de *Cymbopogon citratus*. **Rev. Cuba Plantas Med**, La Habana, v. 8, n. 2, p. 0-0, 2003.

CHAUMONT, J-P.; LÉGER, D. Lutte contre les moisissures allergisants des habitations. Propriétés inhibitrices de l'huile essentielle de géranium 'Bourbon', du citronellol, du géranol et du citral. **Ann. Pharm. Fr**, Paris, v. 50, n. 3, p. 156-166, 1992.

CIMANGA, K.; KAMBU, K.; TONA, L.; APERS, S.; DE BRUYNE, T.; HERMANS, N.; TOTTE, J.; PIETERS, L.; VLIETINCK, A.J. Correlation between chemical composition and antibacterial activity of essential oils of some aromatic medicinal plants growing in the Democratic Republic of Congo. **J. Ethnopharmacol**, Limerick, v. 79, p. 213-220, 2002.

CONTET-AUDONNEAU, N.; SCHMUTZ, J.L. Antifongiques et mycoses superficielles. **Rev. Fr. Lab**, Paris, n. 332, p. 37-48, 2001.

CREVITS, B.; PIGOTO, A.; STABERG, B.; URBANOWSKI, S.; SILNY, W. Comparison of efficacy and safety of oral fluconazole of tinea corporis, tinea cruris, tinea pedis, and cutaneous candidiasis. **Curr. Ther. Res. Clin. Exp**, Trenton, v. 59, n. 7, p. 503-510, 1998.

CRUZ, A.S. **Teste de citotoxicidade “in vitro” como alternativa ao teste “in vivo” de Draize na avaliação de produtos cosméticos.** 2003. Tese (Doutorado) - Programa de Pós-Graduação em Fármaco e Medicamentos, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2003.

De DONKER, P. Itraconazole and terbinafine in perspective: from petri dish to patient. **J. Eur. Acad. Dermatol. Venereol**, Amsterdam, v. 12 (suppl. 1), p. S10-S16, 1999.

Di-DOMENICO, B. Novel antifungal drugs. **Curr. Opin. Microbiol**, New York, v. 2, p. 509-515, 1999.

DRAELOS, Z.D. Botanicals as topical agents. **Clin. Dermatol**, Philadelphia, v. 19, p. 474-477, 2001.

DRAIZE, J.H.; WOODARD, G.; CALVERY, H.O. Methods for the study of irritation and toxicity of substances applied topically to the skin and mucous membranes. **J. Pharmacol. Exp. Ther**, Baltimore, v. 82, p. 377-390, 1944.

EL-KAMALI, H.H.; AHMED, A.H.; MOHAMMED, A.S.; YAHIA, A.A.M.; EL-TAYEB, I.H.; ALI, A.A. Antibacterial properties of essential oils from *Nigella sativa* seeds, *Cymbopogon citratus* leaves and *Pulicaria undulata* aerial parts. **Fitoterapia**, Milano, v. 69, n. 1, p. 77-78, 1998.

ELLIS, M. Invasive fungal infections: evolving challenges for diagnosis and therapeutics. **Mol. Immunol**, Oxford, v. 38, p. 947-957, 2001.

EUN, H.C.; SUHN, D.H. Comprehensive outlook of *in vitro* tests for assessing skin irritancy as alternatives to Draize tests. **J. dermatol. Sci**, Limerick, v. 24, p. 77-91, 2000.

FARMACOPÉIA Brasileira 4. ed. São Paulo: Editora Atheneu, 1988.

FARMACOPÉIA Brasileira 4. ed. São Paulo: Editora Atheneu, 2003. p. 220.

FDA U.S. Food and Drug Administration. Animal Testing. Disponível em <<http://vm.cfsan.fda.gov/~dms/cos-205html>>. Acesso em: 16.09.2004.

FENTEM, J.H.; BRIGGS, D.; CHESNÉ, C.; ELLIOT, G.R.; HARBELL, J.W.; HEYLINGS, J.R.; PORTES, P.; ROGUET, R.; van de SANT, J.J.M.; BOTHAM, P.A. A prevalidation study on *in vitro* tests for acute skin irritation: results and evaluation by Management Team. **Toxicol. in vitro**, New York, v. 15, p. 57-93, 2001.

FERREIRA, M.S.C.; FONTELES, M.C. Aspectos etnobotânicos e farmacológicos do *Cymbopogon citratus* Stapf (capim-limão). **Rev. Bras. Farm**, Rio de Janeiro, v. 70, n. 4, p. 94-97, 1989.

- 
- FESSI, H.; PUISIEUX, F.; DEVISSAGUET, J.P.; AMMOURY, N.; BENITA, S. Nanocapsule formation by interfacial polymer deposition following solvent displacement. **Int. J. Pharm**, Amsterdam, v. 55, p. R1-R4, 1989.
- FIORI, A.C.G.; SCHWAN-ESTRADA, K.R.F.; STANGARLIN, J.R.; VIDA, C.A.; CRUZ, M.E.S.; PASCHOLATI, S.F. Antifungal activity os leaf extracts and essential oils of some medicinal plants against *Didymella bryoniae*. **J. Phytopathol**, Berlin, v. 148, p. 483-487, 2000.
- FOSTER, K.W.; GHANNOUM, M.A.; ELEWSKI, B.E. Epidemiologic surveillance of cutaneous fungal infection in the United States from 1999 to 2002. **J. Am. Acad. Dermatol**, Saint. Louis, v. 50, n. 5, p. 748-752, 2004.
- FREEBURG, E.J.; MISTRY, B.S.; REINECCIUS, G.A. Stability of citral-containing and citralless lemon oils in flavour emulsions and beverages. **Perfum. Flavor**, Wheaton, v. 19, p. 23-32, 1994.
- FRESHNEY, R.I. **Culture of animal cells: a manual of basic technique**. 3 ed. New York: Wiley-Liss, 1994.
- FROSCH, P.J.; PILZ, B.; ANDERSEN, K.E.; BURROWS, D.; CAMARASA, J.G.; DOOMS-GOOSSENS, A.; DUCOMBS, G.; FUCHS, T.; HANNUKSELA, M.; LACHAPPELLE, J.M.; LAHTI, A.; MAIBACH, H.I.; MENNÉ, T.; RYCROFT, R.J.G.; SHAW, S.; WAHLBERG, J.E.; WHITE, I.R.; WILKINSON, J.D. Patch testing with fragrances: results of a multicenter study of the European Environmental and Contact Dermatitis Research Group with 48 frequently used constituents of perfumes. **Contact Dermatitis**, Copenhagen, v. 33, p. 333-342, 1995.
- GALIËN, J. van der. The reactions of fragrances with other ingredients of household cleaning products (2003). Disponível em: <<http://home.zonnet.nl/galien8/fragchem/fragchem.html>>. Acesso em: 22.02.2005.
- GENNARO, A.R. (Ed.) **Remington: the science and practice of pharmacy**. 20 ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2000. 2077 p.
- GRIMM, W.; THOME, K. **Stability testing on drug products**. Stuttgart: Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft, 1987.
- GROOT, A.C.; FROSCH, P.J. Adverse reactions to fragrances – a clinical review. **Contact Dermatitis**, Copenhagen, v. 36, p. 57-86, 1997.
- GUENTHER, E. **The essential oils**. Toronto: D. Van Nostrand Company, v. 4, p. 20-65, 1950.
- GUESS, W.L.; ROSENBLUTH, S.A.; SCHIMIDT, B.; AUTIAN, J. Agar diffusion method for toxicity of plastics on cultures cell monolayers. **J. Pharm. Sci**, Washington, v. 54, n. 10, p. 1545-1547, 1965.

GUPKA, A.K.; SAUDER, D.N.; SHEAR, N.H. Continuing medical education: antifungal agents: an overview. Part I. **J. Am. Acad. Dermatol**, Saint. Louis, v. 30, n. 5, p. 677-698, 1994.

GUPTA, A.; MYRDAL, P.B. Development of a perill alcohol topical cream formulation. **Int. J. Pharm**, Amsterdam, v. 269, p. 373-383, 2004.

GUTERRES, S.S.; FESSI, H.; BARRAT, G.; DEVISSAGUET, J.P.; PUISIEUX, F. Poly(DL-lactide) nanocapsules containing diclofenac: I. Formulation and stability study. **Int. J. Pharm**, Amsterdam, v. 113, p. 57-63, 1995.

HAINER, B.L. Dermatophyte infections. **Am. Fam. Physician**, Kansas City, v. 67, n. 1, p. 101-108, 2003.

HALL, J.C. **Sauer's manual of skin diseases**. 8. ed. Philadelphia: Lippincot Williams & Wilkins, 1999. cap. 19, p. 198-221.

HAMMER, K.A.; CARSON, C.F.; RILEY, T.V. Antimicrobial activity oils and other plant extracts. **J. Applied Microbiol**, Oxford, v. 86, p. 985-990, 1999.

HARRIS, R. Progress with superficial mycoses using essential oils. **Inter. J Aromatherapy**, Provence, v. 12, n. 2, p. 83-91, 2002.

HAYES, A.J.; MARKOVIC, B. Toxicity of Australian essential oil *Backhousia citriodora* (lemon myrtle). Part 1. Antimicrobial activity and *in vitro* cytotoxicity. **Food Chem. Toxicol**, Oxford, v. 40, p. 535-543, 2002.

HEYDORN, S.; JOHANSEN, J.D.; ANDERSEN, K.E.; BRUZE, M.; SVEDMAN, C.; WHITE, I.R.; BASKETTER, D.A.; MENNÉ, T. Fragrance allergy in patients with hand eczema – a clinical study. **Contact Dermatitis**, Copenhagen, v. 48, p. 317-323, 2003a.

HEYDORN, S.; MENNÉ, T.; ANDERSEN, K.E.; BRUZE, M.; SVEDMAN, C.; WHITE, I.R.; BASKETTER, D.A. Citral a fragrance allergen and irritant. **Contact Dermatitis**, Copenhagen, v. 49, p. 32-36, 2003b.

HOELPMAN, I.M.; DUPONT, B. Oral candidiasis: the clinical challenge of resistance and management. **Int. J. Antimicrob. Agents**, Amsterdam, v. 6, p. 155-159, 1996.

HOWARD, D.H.; MILLER, J.D. **The mycota: human and animal relationships**. Berlin: Springer-Verlag, 1996. v.6, p. 253-255.

HUDAIB, M.; BELLARDI, M.G.; RUBIES-AUTONELL, C.; FIORI, J.; CAVRINI, V. Chromatographic (GC-MS, HPLC) and virological evaluations of *Salvia sclarea* infected by BBWV-1. **II Farmaco**, Pavia, v. 56, p. 219-227, 2001.

---

ICH. International conference on harmonization of technical requirements for registration of pharmaceuticals for human use. **Q2B. Validation of analytical procedures: methodology**, 1996a.

ICH. International conference on harmonization of technical requirements for registration of pharmaceuticals for human use. **Stability testing: photostability testing of new drug substances and products**, 1996b.

ICH. International conference on harmonization of technical requirements for registration of pharmaceuticals for human use. **Q1A(R2). Stability testing of new drug substances and products**, 2003a.

ICH. International conference on harmonization of technical requirements for registration of pharmaceuticals for human use. **Q1F. Stability data package for registration applications in climatic zones III and IV**, 2003b.

IFRA. International Fragrance Association. **Citral**. Disponível em: <<http://.ifraorg.org/guideLines.asp>>. Acesso em: 16.02.2005.

INCQS/FIOCRUZ. Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde. Manual de qualidade: ensaio de irritação cutânea primária. Rio de Janeiro:, 2002, 15 p.

INOUE, S.; WATANABE, M.; NISHIYAMA, Y.; TAKEO, K.; AKAO, M.; YAMAGUCHI, H. Antisporulating and respiration-inhibition effects of essential oils on filamentous fungi. **Mycoses**, Berlin, v. 41, p. 403-410, 1998.

INOUE, S.; TSURUOKA, T.; WATANABE, M.; TAKEO, K.; AKAO, M.; NISHIYAMA, Y.; YAMAGUCHI, H. Inhibition effect of essential oils on apical growth of *Aspergillus fumigatus* by vapour contact. **Mycoses**, Berlin, v. 43, p. 17-23, 2000.

INOUE, S.; UCHIDA, K.; YAMAGUCHI, H. *In vitro* and *in vivo* anti-*Trichophyton* activity of essential oils by vapour contact. **Mycoses**, Berlin, v. 44, p. 99-107, 2001.

INOUE, S. Laboratory evaluation of gaseous essential oils (Part 1). **Int. J. Aromather**, Provence, v. 13, n. 2/3, p. 95-107, 2003.

KIBBE, A.H. (Ed). **Handbook of pharmaceutical excipients**. 3 ed. Washington: American Pharmaceutical Association, 2000. p. 401-406.

KIM, S-IL; YI, J-H.; TAK, J-H.; AHN, Y-J. Acaricidal activity of plant essential oils against *Dermanyssus gallinae* (Acari: dermanyssidae). **Vet. Parasitol**, Amsterdam, v. 120, p. 297-304, 2004.

KISHORE, K.; MISHRA, A.K.; CHANSOURIA, J.P.N. Fungitoxicity of essential oils against dermatophytes. **Mycoses**, Berlin, v. 36, p. 211-215, 1993.

- KOMMANABOYINA, B.; RHODES, C.T. Trends in stability, with emphasis on stability during distribution and storage. **Drug Dev. Ind. Pharm**, New York, v. 25, n. 7, p. 857-868, 1999.
- KURITA, N.; MIYAJI, M.; KURANE, R.; TAKAHARA, Y. Antifungal activity of components of essential oils. **Agric. Biol. Chem**, Tokyo, v. 45, n. 4, p. 945-952, 1981.
- LACAZ, C.S.; PORTO, E.; MARTINS, J.E.C.; HEINS-VACCARI, E.M.; MELO, N.T. **Tratado de micologia médica**. 9. ed. São Paulo: Sarvier, 2002. cap. 10, p. 252-352.
- LACHMAN, L.; DELUCA, P.; AKERS, M.J. Testes de estabilidade e fundamentos de cinética química. In: LACKMAN, L.; LIEBERMAN, H.A.; KANIG, J.L. **Teoria e prática na indústria farmacêutica**. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, 2001. v. 2, p. 1277-1355.
- LAUBE, S. Skin infections and ageing. **Ageing Res. Rev**, Oxford, v. 3, p. 69-89, 2004.
- LEGRAND, P.; BARRAT, G.; MOSQUEIRA, V.; FESSI, H.; DEVISSAGUET, J.P. Polymeric nanocapsules as drug delivery systems. A review. **Sci. Tech. Pharm**, Basel, v. 9, n. 5, p. 411-418, 1999.
- LEVINSON, W.; JAWETZ, E. **Microbiologia médica e imunologia**. 4 ed. Porto Alegre: ArtMed, 1998. cap. 48 e 50.
- LIEBSCH, M.; SPIELMANN, H. Currently available *in vitro* methods used in the regulatory toxicology. **Toxicol. Lett**, Amsterdam, v. 127, p. 127-134, 2002.
- LIMA, E.O.; GOMPERTZ, O.F.; PAULO, M.Q.; GIESBRECHT, A.M. *In vitro* antifungal activity of essential oils against clinical isolates of dermatophytes. **Rev. Microbiol**, São Paulo, v. 23, n. 4, p. 235-238, 1992.
- LIMA, E.O.; GOMPERTZ, O.F.; GIESBRECHT, A.M.; PAULO, M.Q. *In vitro* antifungal activity of essential oils obtained from officinal plants against dermatophytes. **Mycoses**, Berlin, v. 36, p. 333-336, 1993.
- LIPOZENCIC, J.; SKERLEV, M.; PASIC, A. An overview: the changing face of cutaneous infections and infestations. **Clin. Dermatol**, Philadelphia, v.20, p. 104-108, 2002.
- LONDOÑO, P.; GAO, X.M.; BOWE, F.; McPHEAT, W.L.; BOOTH, G.; DOUGAN, G. Evaluation of the intranasal challenge route in mice as a mucosal model for *Candida albicans* infection. **Microbiology**, Reading, v. 144, p. 2291-2298, 1998.
- LOOCKWOOD, G.B. Techniques for gas chromatography of volatile terpenoids from a range of matrices. **J. Chromatogr A**, New York, v. 936, p. 23-31, 2001.



- 
- MAHMOUD, A.L-E. Antifungal action and antiaflatoxic properties of some essential oil constituents. . **Lett. Appl. Microbiol**, Oxford, v. 19, p. 110-113, 1994.
- MARRIOT, C. Reologia. In: AULTON, M.E. **Delineamento de formas farmacêuticas**. 2. ed. Porto Alegre: ArtMed, 2005.
- McNAIR, H.M.; MILLER, J.M. **Basic gas chromatography**. New York: John Wiley & Sons, INC, 1997.
- MEZZARI, A. Frequency of dermatophytes in the metropolitan area of Porto Alegre, RS, Brasil. **Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo**, São Paulo, v. 40, n. 2, p. 71-76, 1998.
- MILÃO, D.; KNORST, M.T.; RICHTER, W.; GUTERRES, S.S. Hydrophilic gel containing nanocapsules of diclofenac: development, stability study and physico-chemical characterization. **Pharmazie**, Berlin, v. 58, n. 5, p. 325-329, 2003.
- MIMS, C.A.; PLAYFAIR, J.HL.; ROITT, I.M.; WAKELIN, D.; WILLIAMS, R. **Microbiologia médica**. São Paulo: Editora Manole Ltda, 1995.
- MINAMI, M.; KITA, M.; NAKAYA, T.; YAMAMOTO, T.; KURIYAMA, H.; IMANISHI, J. The inhibitory effect of essential oils on herpes simplex virus type-1 replication *in vitro*. **Microbiol. Immunol**, Tokyo, v. 47, n. 9, p. 681-684, 2003.
- MISHRA, A.K.; DUBEY, N.K. Evaluation of some essential oils their toxicity against fungi causing deterioration of stored food commodities. **Appl. Envir. Microbiol**, Washington, v. 60, n. 4, p. 1101-1105, 1994.
- MONDELLO, F.; BERNARDIS, F.; GIROLAMO, A.; SALVATORE, G.; CASSONE, A. *In vitro* and *in vivo* activity of tea tree oil against azole-susceptible and resistant human pathogenic yeasts. **J. Antimicrob. Chemother**, London, v. 51, p. 1223-1229, 2003.
- MOTOYOSHI, K.; TOYOSHIMA, Y.; SATO, M.; YOSHIMURA, M. Comparative studies on the irritancy of oils and synthetic perfumes to the skin of rabbit, guinea pig, rat, miniature swine and man. **Cosmet. Toiletries**, Carol Stream, v. 94, p. 41-48, 1979.
- MURDAN, S. Drug delivery to the nail following topical application. **Int. J. Pharm**, Amsterdam, v. 236, p. 1-26, 2002.
- NGUEFACK, J.; LETH, V.; ZOLLO, P.H.A.; MATHUR, S.B. Evaluation of five essential oils from aromatic plants of Cameroon for controlling food spoilage and mycotoxin producing fungi. **Int. J. Food Microbiol**, Amsterdam, v. 94, p. 329-334, 2004a.
- NGUEFACK, J.; BUDDE, B.B.; JAKOBSEN, M. Five essential oils aromatic plants Cameroon: their antibacterial activity and ability to permeabilize the cytoplasmic membrane of *Listeria innocua* examined by flow cytometry. **Lett. Appl. Microbiol**, Oxford, v. 39, p. 395-400, 2004b.

- NISHIODA, Y.; YOSHINO, H. Lymphatic targeting with nanoparticulate system. **Adv. Drug Deliv. Rev.**, Amsterdam, v. 47, p. 55-64, 2001.
- NOVAK, E.R. **Tratado de ginecologia**. 10. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1983.
- NUDELMAN, N.S. **Estabilidad de medicamentos**. Buenos Aires: Libreria El Ateneo Editorial, 1975.
- ODDS, F.C.; BROWN, A.J.P.; GOW, N.A.R. Antifungal agents: mechanisms of action. **Trends Microbiol**, Cambridge, v. 11, n. 6, p. 272-279, 2003.
- OECD (2001). Organisation for Economic Co-operation and Development. **Citral**. Disponível em: <<http://www.oecd.org>>. Acesso em: 16.02.2005.
- OECD (2002). Organisation for Economic Co-operation and Development. **Guideline for testing of chemicals: acute dermal irritation/corrosion**. Disponível em <<http://www.oecd.org/dataoecd/45/25/2741642.doc>>. Acesso em: 04.10.2004.
- OGUNLANA, E.O.; HÜGLUND, S.; ONAWUNMI, G.; SKÖLD, O. Effects of lemongrass oil on morphological characteristics and peptidoglycan synthesis of *Escherichia coli* cells. **Microbios**, Cambridge, v. 50, p. 43-59, 1987.
- OHNO, T.; KITA, M.; YAMAOKA, Y.; IMAMURA, S.; YAMAMOTO, T.; MITSUFUJI, S.; KODAMA, T.; KASHIMA, K.; IMANISHI, J. Antimicrobial activity of essential oils against *Helicobacter pylori*. **Helicobacter**, Cambridge, v. 8, n. 3, p. 207-215, 2003.
- ONAWUNMI, G.O.; YISAK, W-AB; OGUNLANA, E.O. Antibacterial constituents in the essential oil of *Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf. **J. Ethnopharmacol**, Limerick, v. 12, p. 279-286, 1984.
- ONAWUNMI, G.O. Evaluation of the antimicrobial activity of citral. **Lett. Appl. Microbiol**, Oxford, v. 9, p. 105-108, 1989.
- OPDYKE, D.L.J. Inhibition of sensitization reactions induced by certain aldehydes. **Food Cosmet. Toxicol**, Oxford, v. 14, p. 197-198, 1976.
- OYEDELE, A.O.; GBOLADE, A.A.; SOSAN, M.B.; ADEWOYIN, F.B.; SOYELU, O.L.; ORAFIDIYA, O.O. Formulation of an effective mosquito-repellent topical product from lemongrass. **Phytomedicine**, Stuttgart, v. 9, p. 259-262, 2002.
- PALACÍN, C.; TARRAGÓ, C.; ORTIZ, J.A. Sertaconazole: pharmacology of a gynecological antifungal agent. **Int. J. Gynaecol. Obstet**, New York, v. 71, p. S37-S46, 2000.

- 
- PALHANO, F.L.; VILCHES, T.T.B.; SANTOS, R.B.; ORLANDO, M.T.D.; VENTURA, J.A.; FERNANDES, P.M.B. Inactivation of *Colletotrichum gloeosporioides* spores by high hydrostatic pressure combined with citral or lemongrass essential oil. **Int. J. Food Microbiol**, Amsterdam, v. 95, p. 61-66, 2004.
- PARANAGAMA, P.A.; ABEYSEKERA, K.H.T.; ABEYWICKRAMA, K.; NUGALIYADDE, L. Fungicidal and anti-aflatoxigenic effects of some essential oil of *Cymbopogon citratus* (DC) Stapf. (lemongrass) against *Aspergillus flavus* Linck. Isolated from stored rice. **Lett. Appl. Microbiol**, Oxford, v. 37, p. 86-90, 2003.
- PARKER, F. Doenças da pele. In: BENNETT, J.C.; PLUM, F. **Tratado de medicina interna**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1997. pt. XXVI.
- PATTANAIK, S.; SUBRAMANYAM, V.R.; RATH, C.C. Effect of essential oils on the viability and morphology of *Escherichia coli* (SP-11). **Microbios**, Cambridge, v. 84, p. 195-199, 1995a.
- PATTANAIK, S.; RATH, C.C.; SUBRAMANYAM, V.R. Characterization of resistance to essential oils in a strain of *Pseudomonas aeruginosa*. **Microbios**, Cambridge, v. 81, p. 29-31, 1995b.
- PELCZAR, M.J.; CHAN, E.C.S.; KRIEG, N.R. **Microbiologia: conceitos e aplicações**. 2. ed. São Paulo: Makron Books, 1996. v. II, cap. 27.
- PINA-VAZ, C.; RODRÍGUEZ, A.G.; PINTO, E.; COSTA-DE-OLIVEIRA, S.; TAVARES, C.; SALGUEIRO, L.; CAVALEIRO, C.; GONÇALVES, M.J.; MARTINEZ-DE-OLIVEIRA, J. Antifungal activity of *Thymus* oils and their major compounds. **Eur. Acad. Dermatol. Venerol**, Amsterdam, v. 18, p. 73-78, 2004.
- PINTO, T.J.A.; OHARA, M.T.; KANEKO, T.M. **Controle biológico de qualidade de produtos farmacêuticos, correlatos e cosméticos**. 2.ed. São Paulo: Atheneu Editora, 2003. cap. 9.
- PINTO-ALPHANDARY, H.; ANDREMONT, A.; COUVREUR, P. Targeted delivery of antibiotics using liposomes and nanoparticles: research and applications. **Int. J. Antimicrob. Agents**, Amsterdam, v. 13, p. 155-168, 2000.
- PRASHAR, A.; LOCKE, I.C.; EVANS, C.S. Cytotoxicity of lavender oil and its major components to human skin cells. **Cell Prolif**, Oxford, v. 37, p. 221-229, 2004.
- QUINTANAR-GUERRERO, D.; ALLÉMANN, E.; DOELKER, E.; FESSI, H. Preparation and characterization of nanocapsules from preformed polymers by a new process based on emulsification-diffusion technique. **Pharm. Res**, New York, v. 15, n. 7, p. 1056-1061, 1998.

- RAJAPAKSE, R.; VAN EMDEN, H.F. Potential of four vegetable oils and ten botanical powders for reducing infestation of cowpeas by *Callosobruchus maculatus*, *C. chinensis* and *C. rhodesianus*. **J. Stored. Prod. Res**, Oxford, v. 33, n. 1, p. 59-68, 1997.
- RAUBER, C.S. **Desenvolvimento e controle de qualidade de formas farmacêuticas plásticas contendo o óleo volátil de *Cymbopogon citratus***. 2001. 162 p. Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2001.
- RAUBER, C.S.; GUTERRES, S.S.; SCHAPOVAL, E.E.S. LC determination of citral in *Cymbopogon citratus* volatile oil. **J. Pharm. Biomed. Anal**, Oxford, v. 37, p. 597-601, 2005.
- ROBINSON, M.K.; OSBORNE, R.; PERKINS, M.A. Strategies for the assessment of acute skin irritation potential. **J. Pharmacol. Toxicol. Methods**, New York, v. 42, p. 1-9, 1999.
- ROBINSON, M.K.; COHEN, C.; de FRAISSINETTE, A. B.; PONEC, M.; WHITTLE, E.; FENTEM, J.H. Non-animal testing strategies for assessment of the skin corrosion and skin irritation potential of ingredients and finished products. **Food. Cosmet. Toxicol**, Oxford, v. 40, p. 573-592, 2002.
- RODGERS, P.; BASSLER, M. Treating onychomycosis. **Am. Fam. Physician**, Kansas City, v. 63, n. 4, p. 663-672, 2001.
- ROMAY, T.; BENÍTEZ, M.; SEBAZCO, C.; MARRERO, O. Irritabilidad oftálmica de una solución compuesta por aceites esenciales de caña santa y orégano. **Rev. Cuba Plantas Med**, La Habana, v. 1, n. 1, p. 30-33, 1996.
- RUPKE, S.J. Fungal skin disorders. **Prim. Care**, Philadelphia, v. 27, n. 2, p. 407-421, 2000.
- SAGON, J. Controle et conditionnement des émulsions. In: SEILLER, M.; PUISIEUX, F. **Galênica 5 – les systèmes dispersés: I – agents de surface et émulsions**. Paris: Technique et Documentation (Lavoisier), 1983.
- SACCHETTI, G.; MAIETTI, S.; MUZZOLI, M.; SCAGLIANTI, M.; MANFREDINI, S.; RADICE, M.; BRUNI, R. Comparative evaluation of 11 essential oils of different origin as functional antioxidants, antiradicals and antimicrobials in foods. **Food Chem**, Barking, v. 91, p. 621-632, 2005.
- SAWAMURA, M.; SON, U-S.; CHOI, H-S.; KIM, M-S.L.; PHI, N.T.L.; FEARS, M.; KUMAGAI, C. Composition changes in commercial lemon essential oil for aromatherapy. **Int. J. Aromather**, Provence, v. 14, p. 24-36, 2004.

- 
- SCHAFFAZICK, S.R.; FREITAS, L.L.; POHLMANN, A.R.; GUTERRES, S.S. Caracterização e estabilidade físico-química de sistemas poliméricos nanoparticulados para administração de fármacos. **Quim. Nova**, São Paulo, v. 26, n. 5, p. 726-737, 2003.
- SCHAFFAZICK, S.R.; POHLMANN, A.R.; CORDOVA, C.A.S.; CRECZYNSKI-PASA, T.B.; GUTERRES, S.S. Protective properties of melatonin-loaded nanoparticles against lipid peroxidation. **Int. J. Pharm**, Amsterdam, v. 289, p. 209-213, 2005.
- SCHOTT, H. Rheology. In: GENNARO, A.R. **Remington: the science and practice of pharmacy**. 20 ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2000. cap. 23, p. 335-355.
- SCHUCK, V.J.A.; FRATINI, M.; RAUBER, C.S.; HENRIQUES, A.; SCHAPOVAL, E.E.S. Avaliação da atividade antimicrobiana de *Cymbopogon citratus*. **Rev. Bras. Ciênc. Farm**, São Paulo, v. 37, n. 1, p. 45-49, 2001.
- SEVERO, L.C.; LONDERO, A.T. Micoses. In: VERONESI, R. **Tratado de infectologia**. São Paulo: Editora Atheneu, 1996. v. 2, cap. 82.
- SIMONETTI, A.B. Diagnóstico laboratorial de infecções ginecológicas. In: SOARES, P.R.B.; BERTUOL, M. **Infecções clínico-cirúrgicas em ginecologia**. Porto Alegre: Artes Médica, 1996.
- SOPPIMATH, K.S.; AMINABHAVI, T.M.; KULKARNI, A.R.; RUDZINSKI, W.E. Biodegradable polymeric nanoparticles as drug delivery devices. **J. Control. Release**, Amsterdam, v. 70, p. 1-20, 2001.
- STEFANAKI, C.; STRATIGOS, A.J.; STRATIGOS, J.D. Skin manifestations of HIV-1 infection in children. **Clin. Dermatol**, Philadelphia, v. 20, p. 74-86, 2002.
- STELTENKAMP, R.J.; BOOMAN, K.A.; DORSKY, J.; KING, T.O.; ROTHENSTEIN, A.S.; SCHWOEPPE, E.A.; SEDLAK, R.I.; SMITH, T.H.F.; THOMPSON, G.R. Citral: a survey of consumer patch-test sensitization. **Food. Cosmet. Toxicol**, Oxford, v. 18, p. 413-417, 1980.
- STEVENSEN, C.J. Aromatherapy in dermatology. **Clin. Dermatol**, Philadelphia, v. 16, p. 689-694, 1998.
- SURESH, B.; SRIRAM, S.; DHANARAJ, S.A.; ELANGO, K.; CHINNASWAMY, K. Anticandidal activity of *Santolina chamaecyparissus* volatile oil. **J. Ethnopharmacol**, Limerick, v. 55, p. 151-159, 1997.
- TAO, L.; PEREIRA, M.A. Quantification of carvone, cineole, perillaldehyde, peril alcohol and sobrerol by isocratic high-performance liquid chromatography. **J. Chromatogr A**, New York, v. 793, p. 71-76, 1998.

TATSUMI, Y.; YOKOO, M.; ARIKA, T.; YAMAGUCHI, H. In vitro antifungal activity of KP-103, a novel triazole derivate, and its therapeutic efficacy against experimental plantar tinea pedis and cutaneous candidiasis in guinea pigs. **Antimicrob. Agents Chemother**, Washington, v. 45, n. 5, p. 1493-1499, 2001.

THE MERCK INDEX. 12 ed. Version 12.3. Microsoft Windows, 2000. CD-ROM.

TISSERAND, R. Essential oil safety I. **Inter. J Aromatherapy**, Provence, v. 7, n. 3, p. 28-32, 1996.

TONG, M.M.; ALTMAN, P.M.; BARNETSON, R. Tea tree oil in treatment of tinea pedis. **Australas J. Dermatol**, Sidney, v. 33, p. 145-149, 1992.

TONNESEN, H.H. Formulation and stability testing of photolabile drugs. **Int. J. Pharm**, Amsterdam, v. 225, p. 1-14, 2001.

TORRES, J.; MÁRQUEZ, M.; CAMPS, F. Sertaconazole in the treatment of mycoses: from dermatology to gynecology. **Int. J. Gynaecol. Obstet**, New York, v. 71, p. S3-S20, 2000.

TORRES-RODRÍGUEZ, J.M.; MADRENYS-BRUNET, N.; MONTSANT, L. Tratamento tópico de la candidosis cutánea experimental del cobayo con eberconazol. **Rev. Iberoam. Micol**, Barcelona, v. 16, p. 43-45, 1999.

UFRGS, Escritório de Interação e Transferência de Tecnologia. RAUBER, C.S.; GUTERRES, S.S.; HENRIQUES, A.T.; SCHAPOVAL, E.E.S. Composições farmacêuticas para o tratamento de afecções cutâneas causadas por *Candida* spp. e fungos dermatófitos e uso de óleo volátil de *C. citratus* nas ditas composições. BR200203521-A.

URIBE, S.; RAMIREZ, J.; PEÑA, A. Effects of  $\beta$ -pinene on yeast membrane functions. **J. Bacteriol**, Washington, v. 161, n. 3, p. 1195-1200, 1985.

USP 28. The United States Pharmacopeia. 28<sup>th</sup>. ed. Rockville: Unites States Pharmacopeial Convention, 2005.

VAN CUTSEN, J. Current topics in medical mycology. 1 – **Animal models for dermatomycotic infections**. New York: Springer-Varlag, 1989.

VARTAK, P.H.; TUNGIKAR, V.B.; SHARMA, R.N. Comparative repellent properties os certain chemicals against mosquitoes, house flies and cockroaches usind modified techniques. **J. Commun. Dis**, Delhi, v. 26, n. 3, p. 156-160, 1994.

VAUTHIER-HOLTZSCHERER, C.; BENABBOU, S.; SPENLEHAUER, G.; VEILLARD, M.; COUVREUR, P. Methodology for the preparation of ultra-dispersed polymer systems. **Sci. Tech. Pharm**, Basel, v. 1, n. 2, p. 109-116, 1991.

- 
- VELLUTI, A.; SANCHIS, V.; RAMOS, A.J.; EGIDO, J.; MARÍN, S. Inhibitory effect of cinnamon, clove, lemongrass, oregano and palmarose essential oils on growth and fumonisin B<sub>1</sub> production by *Fusarium proliferatum* in maize grain. **Int. J. Food Microbiol**, Amsterdam, v. 89, p. 145-154, 2003.
- VELLUTTI, A.; MARÍN, S.; GONZALEZ, P.; RAMOS, A.J.; SANCHIS, V. Initial screening for inhibitory activity of essential oils on growth of *Fusarium verticillioides*, *F. proliferatum* and *F. graminearum* on maize-based agar media. **Food Microbiol**, London, v. 21, p. 649-656, 2004.
- VODA, K.; BOH, B.; VRTACNIK, M. A quantitative structure-antifungal activity relationship study of oxygenated aromatic essential oil compounds using data structuring and PLS regression analysis. **J. Mol. Model**, Berlin, v. 10, p. 76-84, 2004.
- WANNISSORN, B.; JARIKASEM, S.; SOONTORNTANASART, T. Antifungal activity of lemon grass oil and lemon grass cream. **Phytother. Res**, London, v. 10, p. 551-554, 1996.
- WANNISSORN, B.; JARIKASEM, S.; SIRIWANGEHAI, T.; THUBTHIMTHED, S. Antibacterial properties of essential oils from Thain medicinal plants. **Fitoterapia**, Milano, v. 76, p. 233-236, 2005.
- WARD, R.K.; HUBBARD, A.W.; SULLEY, H.; GARLE, M.J.; CLOTHIER, R.H. Human keratinocyte cultures in an *in vitro* approach for the assessment of surfactant-induced irritation. **Toxicol. in vitro**, New York, v. 12, p. 163-173, 1998.
- WARREN, N.G.; HAZEN, K.C. *Candida*, *Cryptococcus* and other yeast of medical importance. In: MURRAY, P.R.; BARON, E.J.; PFALLER, M.A.; TENOVER, F.C.; YOLKEN, R.H. **Manual of clinical microbiology**. 7. ed. Washington: American Society for Microbiology, 1999. p. 1193-1194.
- WATSON, D. **Pharmaceutical analysis. A textbook for pharmacy students and pharmaceutical chemists**. Edinburgh: Churchill Livingstone, 1999. cap. 12, p. 237-276.
- WEINSTEIN, A.; BERMAN, B. Topical treatment of common superficial tinea infections. **Am. Fam. Physician**, Kansas City, v. 65, n. 10, p. 2095-2101, 2002.
- WELSS, T.; BASKETTER, D.A.; SCHRÖDER, K.R. *In vitro* skin irritation: facts and future. State of the art review of mechanisms and models. **Toxicol. in vitro**, New York, v. 18, p. 231-243, 2004.
- WILSONSON, J.B.; MOORE, R.J. **Harry's cosmeticology**. 7. ed. New York: Chemical Publishing, 1982.
- WILSON, N.D.; IVANOVA, M.S.; WATT, R.A.; MOFFAT, A.C. The quantification of citral in lemongrass and lemon oils by near-infrared spectroscopy. **J. Pharm. Pharmacol**, London, v. 54, p. 1257-1263, 2002.

WOLKEN, W.A.M.; TRAMPER, J.; VAN DER WERF, M.J. Toxicity of terpenes to spores and mycelium of *Penicillium digitatum*. **Biotechnol. Bioeng**, New York, v. 80, n. 6, p. 685-690, 2002.

WOOD, J.H. Reologia farmacêutica. In: LACKMAN, L.; LIEBERMAN, H.A.; KANIG, J.L. **Teoria e prática na indústria farmacêutica**. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, 2001. v. 1, p. 211-253.

YOSHIOKA, S.; ISHIHARA, Y.; TERAZONO, T.; TSUNAKAWA, N. et al. Quinine actinometry as a method for calibrating ultraviolet radiation intensity in high-stability testing of pharmaceuticals. **Drug Dev. Ind. Pharm**, New York, v. 22, n. 13, p. 2049-2062, 1994.







**ANEXO 10.1** – Valores de viscosidade apresentados para a formulação ENIO3 (n = 3).

<b>Velocidade (rpm)</b>	<b>Viscosidade (cP) ± s (curva ascendente)</b>	<b>DPR</b>	<b>Viscosidade (cP) ± s (curva descendente)</b>	<b>DPR</b>
0,5	434533 ± 24412	5,62	272933 ± 13738	5,03
1,0	214033 ± 10424	4,87	181433 ± 5811	3,20
2,0	139700 ± 7153	5,12	125000 ± 5311	4,25
2,5	115567 ± 5658	4,90	107367 ± 2566	2,39
4,0	88813 ± 1236	1,39	84840 ± 1532	1,81
5,0	78363 ± 2105	2,69	-	-

**ANEXO 10.2** – Valores de tensão de cisalhamento apresentados para a formulação ENIO3 (n = 3).

<b>Velocidade de cisalhamento (s<sup>-1</sup>)</b>	<b>Tensão de cisalhamento (D/cm<sup>2</sup>) (curva ascendente)</b>	<b>Tensão de cisalhamento (D/cm<sup>2</sup>) (curva descendente)</b>
0,11	478	300
0,22	471	399
0,44	615	550
0,55	636	591
0,88	782	747
1,10	862	-

**ANEXO 10.3** – Valores de viscosidade apresentados para a formulação ENIO5 (n = 3).

<b>Velocidade (rpm)</b>	<b>Viscosidade (cP) ± s (curva ascendente)</b>	<b>DPR</b>	<b>Viscosidade (cP) ± s (curva descendente)</b>	<b>DPR</b>
0,5	343600 ± 14400	4,19	279933 ± 7463	2,67
1,0	180900 ± 2551	1,41	169733 ± 7801	4,60
2,0	119167 ± 1724	1,45	113300 ± 2170	1,92
2,5	100680 ± 906	0,90	99643 ± 4021	4,04
4,0	77960 ± 1141	1,46	76400 ± 1338	1,75
5,0	67963 ± 1132	1,67	-	-

**ANEXO 10.4** – Valores de tensão de cisalhamento apresentados para a formulação ENIO5 (n = 3).

Velocidade de cisalhamento (s <sup>-1</sup> )	Tensão de cisalhamento (D/cm <sup>2</sup> ) (curva ascendente)	Tensão de cisalhamento (D/cm <sup>2</sup> ) (curva descendente)
0,11	378	308
0,22	398	373
0,44	524	499
0,55	554	548
0,88	686	672
1,10	748	-

**ANEXO 10.5** – Valores de viscosidade apresentados para a formulação ENINC<sub>OV</sub> (n = 3).

Velocidade (rpm)	Viscosidade (cP) ± s (curva ascendente)	DPR	Viscosidade (cP) ± s (curva descendente)	DPR
2,0	72013 ± 6858	9,52	80560 ± 2164	2,69
2,5	67423 ± 4322	6,41	68746 ± 2324	3,38
4,0	53540 ± 2194	4,10	52180 ± 3935	7,54
5,0	46080 ± 831	1,80	47580 ± 2729	5,74
10,0	33370 ± 1485	4,45	-	-

**ANEXO 10.6** – Valores de tensão de cisalhamento apresentados para a formulação ENINC<sub>OV</sub> (n = 3).

Velocidade de cisalhamento (s <sup>-1</sup> )	Tensão de cisalhamento (D/cm <sup>2</sup> ) (curva ascendente)	Tensão de cisalhamento (D/cm <sup>2</sup> ) (curva descendente)
0,44	317	354
0,55	371	378
0,88	471	459
1,10	507	523
2,20	734	-

**ANEXO 10.7** – Valores de viscosidade apresentados para a formulação GHO (n = 3).

<b>Velocidade (rpm)</b>	<b>Viscosidade (cP) ± s (curva ascendente)</b>	<b>DPR</b>	<b>Viscosidade (cP) ± s (curva descendente)</b>	<b>DPR</b>
2,0	482467 ± 21032	4,36	473733 ± 29675	6,26
2,5	410933 ± 21439	5,22	402800 ± 24362	6,05
4,0	286533 ± 8751	3,05	282567 ± 15636	5,53
5,0	239633 ± 6478	2,70	237033 ± 11836	4,99
10,0	137333 ± 3019	2,20	136633 ± 4402	3,22
20,0	79063 ± 1924	2,43	-	

**ANEXO 10.8** – Valores de tensão de cisalhamento apresentados para a formulação GHO (n = 3).

<b>Velocidade de cisalhamento (s<sup>-1</sup>)</b>	<b>Tensão de cisalhamento (D/cm<sup>2</sup>) (curva ascendente)</b>	<b>Tensão de cisalhamento (D/cm<sup>2</sup>) (curva descendente)</b>
0,44	2123	2084
0,55	2260	2215
0,88	2521	2487
1,10	2636	2607
2,20	3021	3006
4,40	2479	-

**ANEXO 10.9** – Valores de viscosidade apresentados para a formulação GLO (n = 3).

<b>Velocidade (rpm)</b>	<b>Viscosidade (cP) ± s (curva ascendente)</b>	<b>DPR</b>	<b>Viscosidade (cP) ± s (curva descendente)</b>	<b>DPR</b>
2,0	63100 ± 6427	10,18	64480 ± 6535	10,13
2,5	53310 ± 4600	8,63	55740 ± 4910	8,81
4,0	37973 ± 2233	5,88	39753 ± 3063	7,70
5,0	31580 ± 2092	6,63	32793 ± 2551	7,78
10,0	18463 ± 1233	6,68	-	-

**ANEXO 10.10** – Valores de tensão de cisalhamento apresentados para a formulação GLO (n = 3).

<b>Velocidade de cisalhamento (s<sup>-1</sup>)</b>	<b>Tensão de cisalhamento (D/cm<sup>2</sup>) (curva ascendente)</b>	<b>Tensão de cisalhamento (D/cm<sup>2</sup>) (curva descendente)</b>
0,44	278	284
0,55	293	307
0,88	334	350
1,10	347	347
2,20	406	-

**ANEXO 10.11** – Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa da UFRGS.

**ANEXO 10.12** – Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa da USP.



**ANEXO 10.13** – Pareceres da Banca Examinadora.





