



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO  
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE  
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**

**ELISANA AFONSO DE MOURA PIRES**

**DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE METODOLOGIAS ANALÍTICAS  
PARA A AVALIAÇÃO DA QUALIDADE DE MATÉRIAS-PRIMAS E  
MICROEMULSÕES COM ATIVIDADE LEISHMANICIDA**

**Recife**

**2014**

**ELISANA AFONSO DE MOURA PIRES**

**DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE METODOLOGIAS ANALÍTICAS  
PARA A AVALIAÇÃO DA QUALIDADE DE MATÉRIAS-PRIMAS E  
MICROEMULSÕES COM ATIVIDADE LEISHMANICIDA**

Tese, como requisito complementar, para obtenção do grau de Doutor em Ciências Farmacêuticas, na área de concentração de Produção e Controle de Medicamentos, submetida ao Programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Pernambuco.

Orientador: Prof. Dr. Rui Oliveira Macedo

**Recife**

**2014**

Catálogo na Fonte  
Bibliotecária: Gláucia Cândida, CRB4-1662

- P167d Pires, Elisana Afonso de Moura.  
Desenvolvimento e validação de metodologias analíticas para a avaliação da qualidade de matérias-primas e microemulsões com atividade leishmanicida / Elisana Afonso de Moura Pires. – Recife: O autor, 2014.  
129 f. il. ; 30 cm.
- Orientador: Rui Oliveira Macedo.  
Tese (doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco, CCS. Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, 2014.  
Inclui referências.
1. Controle de Qualidade. 2. Formulação Farmacêutica. 3. Leishmaniose. 4. Microemulsão. I. Macedo, Rui Oliveira. (Orientador). II. Título.
- 615.3 CDD (23.ed.) UFPE (CCS2014-174)

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO**  
**PRÓ-REITORIA PARA ASSUNTOS DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO**  
**CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE**  
**DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**

Recife, 19 de março de 2014.

Defesa de Tese de Doutorado de **Elisana Afonso de Moura Pires** defendida e **APROVADA**, por decisão unânime, em 19 de março de 2014 e cuja Banca Examinadora foi constituída pelos seguintes professores:

**PRESIDENTE, ORIENTADOR E EXAMINADOR INTERNO: Prof. Dr. Rui Oliveira Macedo**

(Depto. de Farmácia da Universidade Federal da Paraíba - UFPB).

Assinatura: \_\_\_\_\_

**EXAMINADORA INTERNA: Prof. Dra. Ana Cristina Lima Leite**

(Depto. de Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Pernambuco - UFPE).

Assinatura: \_\_\_\_\_

**EXAMINADOR EXTERNO: Prof. Dr. Danilo César Galindo Bedor**

(Depto. de Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Pernambuco - UFPE).

Assinatura: \_\_\_\_\_

**EXAMINADORA EXTERNA: Profa. Dra. Louisianny Guerra da Rocha**

(Depto. de Microbiologia e Parasitologia da Universidade Federal do Rio Grande do Norte - UFRN).

Assinatura: \_\_\_\_\_

**EXAMINADOR EXTERNO: Prof. Dr. Ticiano Gomes do Nascimento**

(Escola de Enfermagem e Farmácia - UFAL).

Assinatura: \_\_\_\_\_

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO**

**Reitor**

Prof. Anísio Brasileiro de Freitas Dourado

**Vice-Reitor**

Prof. Silvio Romero de Barros Marques

**Pró-Reitoria para Assuntos de Pesquisa e Pós-Graduação**

Prof. Francisco de Sousa Ramos

**Diretor do Centro de Ciências da Saúde**

Prof. Nicodemos Teles de Pontes Filho

**Vice-Diretor do Centro de Ciências da Saúde**

Prof.<sup>a</sup> Vânia Pinheiro Ramos

**Coordenador do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas**

Prof. Almir Gonçalves Wanderley

**Vice-Coordenadora do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas**

Prof.<sup>a</sup> Ana Cristina Lima Leite

À Deus, por seu infinito amor. Por me guiar e iluminar em todos os caminhos.  
“Tudo é do Pai, toda honra e toda glória, é dele a vitória alcançada em minha vida.”

Aos meus pais, Pedro e Eliane, alicerces de uma vida, grandes incentivadores deste trabalho e incansáveis na minha educação e felicidade.

À minha filha Lara, o grande amor da minha vida.  
Você é o que realmente importa.

Ao meu marido Hallisson por todo amor, paciência e compreensão. Você é a parte que eu não tinha.

Aos meus irmãos Elisângela e Erick Afonso de Moura, pela amizade e cumplicidade.

As irmãs da minha filha Letícia e Yasmin, sobrinhas amadas, pela alegria com que vocês transformam o dia.

Dedico.

## AGRADECIMENTOS

Ao **Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal Pernambuco (PPGCF-UFPE)** pela oportunidade concedida na minha formação acadêmica.

Ao meu orientador, **Prof. Dr. Rui Oliveira Macedo** por todas as oportunidades, ensinamentos e compreensão. Seguindo sua orientação os caminhos foram direcionados. A confiança, amizade e carinho foram crescentes e nunca serão modificados.

A todos que fazem parte do **Laboratório Unificado de Desenvolvimento e Ensaio de Medicamentos** da UFPB, em especial a **Horacina, Valmir, Hayane e Taynara**, pela companhia agradável e pela ajuda em momentos importantes deste trabalho.

Ao prof. **Dr. Fábio Santos Souza**, pelos conselhos e ajuda sempre que o procurei.

Ao prof. **Dr. Celso Amorin Câmara** pela colaboração com o fornecimento das moléculas leishmanicidas.

A **Profa. Dra. Leila Bastos Leal**, do Núcleo de Desenvolvimento Farmacêutico e Cosmético (NUDFAC), por ter aceitado contribuir com este trabalho e pela gentileza com que nos recebeu em seu laboratório, e disponibilizou as amostras, em especial a **Alice Maciel** pela sempre simpática disposição em ajudar quando precisei.

A profa. **Dra. Louisianny Guerra da Rocha**, do Laboratório de Ensaio Antiparasitários e de Radiologia Experimental da UFRN, pela forma amigável e parceira com a qual se prontificou em participar deste trabalho, colaborando de maneira fundamental com os ensaios de citotoxicidade e atividade leishmanicida. Obrigada pelo tempo e atenção dedicados ao nosso projeto.

Ao prof. **Dr. Bolívar Ponciano Goulart de Lima Damasceno e ao Prof. Dr. José Alessandro da Silva**, por terem gentilmente nos recebido no Laboratório de Desenvolvimento e Caracterização de Produtos Farmacêuticos (LDCPF) e nos iniciado nos ensaios com as Células de Franz, em especial a **Airla Laana de Medeiros Cavalcanti** pela gentileza com que se prontificou a nos ajudar nestes ensaios.

Ao **Prof. Dr. Eduardo de Jesus Oliveira** do Centro de Biotecnologia (CBiotec), pela delicadeza e confiança na disponibilização das Células de Franz, contribuindo com nosso projeto.

Aos professores da Comissão Examinadora: **Profa. Dra. Ana Cristina Lima Leite, Profa. Dra. Louisianny Guerra da Rocha, Prof. Dr. Danilo Cesar Galindo Bedor e Prof. Dr. Ticiano Gomes do Nascimento** por terem aceitado o convite para compor a banca e contribuir de forma fundamental para o aprimoramento deste trabalho.

Ao **CNPQ** pela concessão da bolsa e financiamento do projeto.

Aos meus queridos amigos e parceiros,

Vald, **José Valdilânio Procópio**, a mente brilhante do nosso grupo. Ferraz, **Márcia Ferraz Pinto**, sempre presente em todos os momentos. Decisiva no final desta tese. Parceira de caminhada. Anita, **Ana Flávia Oliveira Santos**, sempre presente e cúmplice, obrigada por todo apoio, todas as palavras de amizade e estímulos. Suas palavras me iluminaram em muitos momentos. Lid, **Lidiane Pinto Correia**, sempre amiga, prestativa e leve. Muito fácil gostar de você! A minha querida amiga **Agna Hélia Oliveira** pela amizade, pelos conselhos sempre presentes em minha vida. A vocês o meu profundo agradecimento e admiração.

Aos meus amigos pessoais, que apesar de não participarem da minha vida acadêmica, compartilharam comigo as alegrias e angústias de cada etapa deste trabalho.

*A amizade não se força, não se compra não se vende,  
ela acontece, lentamente, em silêncio, devagar.  
Cada um que passa em nossa vida passa sozinho,  
porque é único para nós,mas não vai sozinho e nem nos deixa só.  
Leva um pouco de nós mesmos e deixa um pouco de si mesmo.  
Essa é a mais bela responsabilidade de nossa vida,  
a prova de que as almas não se encontram por acaso.  
(Antoine de Saint-Exupéry)*

“É impossível para um homem aprender aquilo que ele acha que já sabe.”

**Epiteto (Filósofo Grego).**

## RESUMO

A leishmaniose é uma das doenças tropicais mais negligenciadas em termos de desenvolvimentos e descoberta de novos medicamentos. Neste sentido, a busca por novas moléculas, incorporação de fármacos em sistemas de liberação, o uso da terapia combinada e de tratamentos alternativos leishmanicidas é imprescindível. Esta pesquisa teve como objetivo desenvolver metodologias analíticas para a avaliação de qualidade de matérias-primas e formulações com atividade leishmanicida. Uma nova molécula de derivado naftoquinônico, análogo da beta-lapachona (HBL), com potente atividade antileishmania, foi caracterizada por termogravimetria (TG), calorimetria exploratória diferencial (DSC), dissolução intrínseca e cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). Óleos essenciais obtidos a partir das espécies *Cymbopogon citratus* e *Cymbopogon nardus* foram caracterizados e identificados utilizando a cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa (CG-EM). Microemulsões foram preparadas contendo os óleos essenciais de *C. citratus* (ME-citratus) e *C. nardus* (ME-nardus). Métodos analíticos de quantificação dos óleos essenciais e microemulsões, com base no teor dos marcadores citral e citronelal, foram desenvolvidos e validados utilizando a cromatografia gasosa com detector de chama (CG-DIC). Os óleos essenciais e as microemulsões obtidas foram avaliados quanto à atividade leishmanicida frente às formas promastigotas de *Leishmania chagasi*. O ensaio de citotoxicidade dos óleos livres e incorporados nas microemulsões foi realizado frente às células 3T3 (fibroblastos de murinos Swiss albinos). Os sistemas microemulsionados foram caracterizados através da determinação do pH, tamanho de partícula, índice de polidispersão (IDP), potencial zeta, condutividade, doseamento e cinética de liberação. Na caracterização das moléculas sintéticas HBL, os dados TG e DSC mostraram diferenças de comportamento térmico entre as amostras, permitindo classificar lotes de HBL em três grupos com estabilidade física e térmica diferentes. Os dados cromatográficos e de dissolução intrínseca evidenciaram características distintas de pureza e solubilidade entre os lotes de HBL. A identificação e padronização dos óleos por CG-EM revelou como constituintes majoritários o citral (66,22%) para o *C. citratus* e o citronelal (37,98%) para o *C. nardus*. Os métodos analíticos desenvolvidos apresentaram linearidade na faixa de concentração 89,30 a 714,40 µg/mL para o citral e 85,50 a 342,00 µg/mL para o citronelal. As metodologias apresentaram precisão, exatidão, seletividade e robustez. As microemulsões (ME) apresentaram pH compatíveis com a administração tópica, tamanho de partícula em escala nanométrica, índice de polidispersão IDP < 0,3, potencial zeta negativo, condutividade condizente com sistemas O/A e cinética de liberação, utilizando as células de Franz, de ordem zero. Os dados DSC *cooling* caracterizaram as ME como O/A. O doseamento dos óleos essenciais nas ME foi de 29,58 mg/mL de citral para ME-citratus e de 19,73 mg/mL do citronelal para ME-nardus. Os óleos *C. citratus* e *C. nardus* apresentaram importante atividade leishmanicida para a *L. chagasi* com CE50 de 26,12 µg/mL para o *C. citratus* e 16,92 µg/mL para o *C. nardus*. Sendo esta atividade potencializada para a ME-citratus e ME-nardus. Os óleos e ME não apresentaram citotoxicidade para as células 3T3. O estudo da molécula HBL permitiu observar a dificuldade na síntese de uma molécula promissora tendo em vista ao desenvolvimento tecnológico da matéria-prima. As técnicas analíticas evidenciaram as ME-citratus e ME-nardus como sistemas de liberação promissores para o tratamento tópico da leishmaniose.

**Palavras-chave:** Controle de qualidade. Formulação Farmacêutica. Microemulsão. Leishmaniose.

## ABSTRACT

Leishmaniasis is one of the most neglected tropical disease in terms of development and discovery of new drugs. In this sense, the research for new molecules, incorporation of drugs in delivery systems, use of combination therapy and antileishmanial alternative treatments is essential. This research aimed to develop analytical methods for raw materials and formulations with leishmanicidal activity quality control. A new naftoquinonic molecule derived, analogue of beta-lapachone (HBL) with potent antileishmanial activity, was characterized by thermogravimetry (TG), differential scanning calorimetry (DSC), intrinsic dissolution and high performance liquid chromatography (HPLC). Essential oils obtained from *Cymbopogon citratus* species and *Cymbopogon nardus* were characterized and identified using gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS). Microemulsions were prepared containing the essential oils of *C. citratus* (ME-citratus) and *C. nardus* (ME-nardus). Analytical methods for the quantification of essential oils and microemulsions were developed and validated using gas chromatography with flame detector (GC-FID) based on the content of citral and citronellal markers. *C. citratus* and *C. nardus* essential oils and microemulsions obtained were evaluated for antileishmanial activity against promastigotes of *Leishmania chagasi*. The cytotoxicity assay of free and incorporated oil in the microemulsions front 3T3 cells (murine fibroblast Swiss albino) were performed. The microemulsion systems were characterized by determining the pH, particle size, polydispersity index (PDI), zeta potential, conductivity, assay and release kinetics. The characterization of synthetic molecules HBL, TG and DSC data showed differences in behavior between samples, allowing to sort lots of HBL into three groups with physical and thermal stability differences. The chromatographic data and intrinsic dissolution showed distinct characteristics of purity and solubility between batches of HBL. The GC-MS oils identification and standardization revealed as major constituents citral (66.22%) to *C. citratus* and citronellal (37.98%) to *C. nardus*. The analytical methods developed showed linearity in the concentration range from 89.30 to 714.40 mg/mL for citral and from 85.50 to 342.00 mg/mL to citronellal. The methodologies presented precision, accuracy, selectivity, and robustness. The ME had pH compatible with topical administration, particle size in the nanometer scale, index lower than 0.3, negative zeta potential, conductivity consistent with O/W systems and release kinetics using Franz cells, zero order. DSC cooling data characterized the ME as O/W. The assay of essential oils were settled at 29.58 mg/mL of ME-citral to citratus and 16.92 mg/mL of ME-nardus to citronellal. The oils *C. citratus* and *C. nardus* showed significant leishmanicidal activity for *L. chagasi* with EC50 of 26.12 mg/mL for *C. citratus* and 28.28 mg/mL for *C. nardus*. This activity being enhanced to ME-citratus and ME-nardus. Oils and ME showed no cytotoxicity to 3T3 cells. The study of HBL molecule allowed to observe the distance that still exists between the synthesis of a promising molecule and its technological development until the raw material. The analytical techniques showed the ME-citratus and ME-nardus promising systems for the topical treatment of leishmaniasis.

**Keywords:** Quality control. Pharmaceutical formulation. Leishmaniasis. Microemulsion.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

### Revisão de Literatura

**Figura 1** – Fotos das manifestações clínicas da leishmaniose. (1) Cutânea localizada; (2) Cutânea difusa; (3) Mucocutânea; (4) Visceral ----- 25

### Caracterização do Derivado Naftoquinônico (HBL)

**Figura 1** – Estrutura química do HBL ----- 47

**Figura 2** – Curvas calorimétricas de amostras do HBL na razão de aquecimento de 10°C/min ----- 50

**Figura 3** – Imagens do DSC fotovisual das amostras de HBL. (1) HBL-1; (2) HBL-2; (3) HBL-3; (4) HBL-4; (5) HBL-5; e (6) HBL-6 ----- 51

**Figura 4** – Curvas termogravimétricas do HBL na razão de aquecimento de 10°C/min ----- 52

**Figura 5** – Perfis cromatográficos do HBL-1, HBL-2, HBL-3, HBL-4, HBL-5 e HBL-6 em 280 nm ----- 54

**Figura 6** – Correlação dos dados das amostras HBL-2, HBL-3 e HBL-5 ----- 56

### Desenvolvimento e Validação

**Figura 1** – Especificidade do método para determinação do teor de citral no óleo essencial *C. citratus* e ME-citratus, determinada por CG-FID. Cromatogramas da injeção do solvente hexano (A), branco da matriz (B), citral padrão (C), óleo essencial citral (D) e ME-citratus (E) ----- 72

**Figura 2** – Especificidade do método para determinação do teor de citronelal em óleo essencial *C. nardus* e ME-nardus, determinada por CG-FID. Cromatograma da injeção do solvente de solubilização (A), branco da matriz (B), citronelal padrão (C), óleo essencial citronelal (D) e ME-nardus (E) ----- 73

**Figura 3** – Seletividade do método determinada por CG-EM. Cromatogramas do marcador citral recém-preparado e das amostras de *C. citratus* após estresse (A), espectro da quebra de massa do marcador citral recém preparado (B), espectros do citral nas amostras *C. citratus* após degradação térmica (C), hidrólise ácida (D), neutra (E), alcalina (F) e oxidativa (G). Espectros referentes à quebra de massa do geranial (citral  $\beta$ ).----- 74

**Figura 4** – Seletividade do método determinada por CG-EM. Cromatogramas do marcador citral recém-preparado e das amostras de *C. citratus* após estresse (A), espectro da quebra de massa do marcador citral recém preparado (B), espectros do citral nas amostras *C. citratus* após degradação térmica (C), hidrólise ácida (D), neutra (E), alcalina (F) e oxidativa (G). Espectros referentes à quebra de massa do geranial (citral  $\alpha$ ).----- 75

**Figura 5** - Seletividade do método determinada por CG-EM. Cromatogramas do marcador citronelal recém-preparado e das amostras de *C. nardus* após estresse (A), espectro da quebra de massa do marcador citronelal recém-preparad (B), espectros do citronelal nas amostras *C. nardus* após degradação térmica (C), hidrólise ácida (D), neutra (E), alcalina (F) e oxidativa (G).----- 76

### Caracterização de Microemulsões

**Figura 1** – Sistema de células de difusão de Franz adaptado ----- 89

**Figura 2** – Cromatogramas CG-EM do óleos essencial *C. citratus* (A) e *C. nardus* (B), com os principais constituintes identificados ----- 91

<b>Figura 3</b> – Formulações das microemulsões de <i>C. citratus</i> e de <i>C. nardus</i> após 24 horas da obtenção -----	92
<b>Figura 4</b> – Curvas calorimétricas em ciclo de resfriamento/aquecimento dos excipientes isolados e da ME-citratus -----	94
<b>Figura 5</b> – Curvas calorimétricas em ciclo de resfriamento/aquecimento dos excipientes isolados e da ME-nardus -----	95
<b>Figura 6</b> – Imagem da ME-citratus (A) e ME-nardus (B) após centrifugação na rotação máxima de 863 g -----	95
<b>Figura 7</b> – Representação gráfica das quantidades acumulada de citral liberadas através das membranas de PVDF, NC e PTFE, em cada tempo de coleta, a partir da ME-citratus -----	97
<b>Figura 8</b> – Representação gráfica das quantidades acumulada de citronelal liberadas através das membranas de PVDF, NC e PTFE, em cada tempo de coleta, a partir da ME-nardus -----	97
<b>Figura 9</b> – Modelo cinético de Higuchi para a liberação do citral nas três membranas estudadas -----	98
<b>Figura 10</b> – Modelo cinético de Higuchi para a liberação do citronelal nas três membranas estudadas -----	99

#### **Atividade Leishmanicida e Citotoxicidade**

<b>Figura 1</b> – Percentagem da viabilidade celular da <i>L. chagasi</i> frente a concentrações crescentes da ME (microemulsão sem a adição do óleo essencial), do óleo essencial <i>C. citratus</i> , da ME-citratus e do citral -----	108
<b>Figura 2</b> – Percentagem da viabilidade celular da <i>L. chagasi</i> frente a concentrações crescentes da ME (microemulsão sem a adição do óleo essencial), do óleo essencial <i>C. nardus</i> , da ME-nardus e do citronelal -----	109
<b>Figura 3</b> – Toxicidade em diferentes concentrações do óleo essencial <i>C. citratus</i> e ME-citratus na viabilidade das células 3T3, comparado ao controle positivo (SDS) e ao negativo (PBS) -----	111
<b>Figura 4</b> – Toxicidade em diferentes concentrações do óleo essencial <i>C. nardus</i> e ME-nardus na viabilidade das células 3T3, comparado ao controle positivo (SDS) e ao negativo (PBS) -----	111

## LISTA DE TABELAS

### Caracterização de Derivado Naftoquinônico (HBL)

<b>Tabela 1</b> – Percentual relativo, em relação a área total, dos picos correspondentes ao HBL-1, HBL-2, HBL-3, HBL-4, HBL-5 e HBL-6 e as impurezas em 280 nm -----	55
---	----

### Desenvolvimento e Validação

<b>Tabela 1</b> – Parâmetros avaliados para a determinação da robustez do método para os óleos essenciais -----	63
<b>Tabela 2</b> – Variações das condições cromatográficas (CG-DIC) para a quantificação do marcador citronelal -----	67
<b>Tabela 3</b> – Condições cromatográficas (CG-DIC) para a quantificação dos marcadores citral e citronelal em óleos essenciais e microemulsões -----	68
<b>Tabela 4</b> – Resultados da robustez com relação a variação da temperatura do injetor, detector, fabricante do solvente n-hexano e estabilidade dos óleos essenciais <i>C. citratus</i> e <i>C. nardus</i> -----	69
<b>Tabela 5</b> – Resultados da robustez com relação ao parâmetro variação de temperatura do injetor e detector para as microemulsões -----	70
<b>Tabela 6</b> – Resultado do tratamento estatístico obtido por ANOVA fator único para a regressão linear do método para determinação de teor do marcador citral no óleo essencial <i>C. citratus</i> -----	71
<b>Tabela 7</b> – Resultado do tratamento estatístico obtido por ANOVA fator único para a regressão linear do método para determinação de teor do marcador citronelal no óleo essencial <i>C. nardus</i> -----	71
<b>Tabela 8</b> – Repetibilidade e precisão intermediária do método analítico para determinação do teor do marcador citral em óleo essencial <i>C. citratus</i> e ME-citratus -----	77
<b>Tabela 9</b> – Repetibilidade e precisão intermediária do método analítico para determinação do teor do marcador citronela em óleo essencial <i>C. nardus</i> e ME-nardus -----	77
<b>Tabela 10</b> – Exatidão em três diferentes níveis para teor de citral em óleo essencial <i>C. citratus</i> e ME-citratus -----	78
<b>Tabela 11</b> – Exatidão em três diferentes níveis para teor de citronelal em óleo essencial <i>C. nardus</i> e ME-nardus -----	79

### Caracterização de Microemulsões

<b>Tabela 1</b> – Resultados do pH e da condutividade dos excipientes e das formulações sem e com a incorporação dos óleos essenciais -----	93
<b>Tabela 2</b> – Resultados do tamanho da gotícula, índice de polidispersão e potencial zeta das formulações -----	94
<b>Tabela 3</b> – Coeficiente de correlação para a liberação do citral a partir das três membranas estudadas -----	98
<b>Tabela 4</b> – Coeficiente de correlação para a liberação do citronelal a partir das três membranas estudadas -----	98
<b>Tabela 5</b> – Velocidade de liberação e <i>lag time</i> do citral através das membranas pelo método de Higuchi -----	99
<b>Tabela 6</b> – Velocidade de liberação e <i>lag time</i> do citronelal através das membranas pelo método de Higuchi -----	99

## LISTA DE EQUAÇÕES

<b>Caracterização de Derivado Naftoquinônico (HBL)</b>	
<b>Equação 1</b> – Velocidade de dissolução intrínseca -----	48
<b>Desenvolvimento e Validação</b>	
<b>Equação 1</b> – Limite Inferior de Detecção -----	64
<b>Equação 2</b> – Limite Inferior de Quantificação -----	64
<b>Equação 3</b> – Exatidão -----	66
<b>Atividade Laishmanicida e Citotoxicidade</b>	
<b>Equação 1</b> – Percentual de células vivas -----	107

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANOVA – Análise de Variância  
ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária  
A/O – Sistema Água/Óleo  
BOD – Demanda Bioquímica de Oxigênio  
CETENE – Centro de Tecnologias Estratégicas do Nordeste  
CE50 – Concentração Efetiva Mediana  
CG – Cromatografia Gasosa  
CG-DIC – Cromatografia Gasosa acoplada ao Detector de Ionização de Chama  
CG-EM – Cromatografia Gasosa acoplada a Espectrometria de Massa  
DIC – Detector de Ionização de Chama  
DMEM – Meio de Cultura de Eagle Modificado por Dulbecco  
DMSO – Dimetilsufóxido  
DSC – Calorimetria Exploratória Diferencial  
DTA – Análise Térmica Diferencial  
DTN – Doenças Tropicais Negligenciadas  
E.E. – Eficácia de Encapsulação  
ELISA – Do inglês *Enzyme Linked Immunosorbent Assay*  
EM – Espectrometria de Massa  
FE – Fase estacionária  
FM – Fase móvel  
HBL – Homo beta-lapachona  
ICH – Do inglês *International Conference Harmonization*  
ICTAC – Do inglês *International Confederation for Thermal Analysis and Calorimetry*  
CI50 – Concentração Inibitória Mediana  
IPD – Índice de Polidispersão  
LCD – Leishmaniose Cutânea Difusa  
LCL – Leishmaniose Cutânea Localizada  
LIT – Infusão de Fígado e Triptose  
LMC – Leishmaniose Mucocutânea  
LOD – Limite Inferior de Detecção  
LOQ – Limite Inferior de Quantificação  
LV – Leishmaniose Visceral  
ME – Microemulsão  
MS – Ministério da Saúde  
MTT – Brometo de 3-(4,5-dimetil-tiazol-2-il)-2,5-difenil-tetrazólio  
NC – Nitrocelulose  
NOS – Óxido Nítrico Sintase  
NUDFAC – Núcleo de Desenvolvimento Farmacêutico e Cosmético  
O/A – Sistema Óleo/Água  
SFB – Soro Fetal Bovino  
Sb(III) – Antimonial Trivalente  
Sb(V) – Antimonial Pentavalente  
SDS – Dodecil Sulfato de sódio  
SVS – Sistema de Vigilância Sanitária  
PA – Para Análise  
PSB – Solução Tampão Fosfato  
P&D – Pesquisa e Desenvolvimento

PF – Ponto de Fusão  
pH – Potencial Hidrogeniônico  
PTFE – Politetrafluoretileno  
PVDF – Fluoreto de Polivinilideno  
SDS – Dodecil Sulfato de Sódio  
TG – Termogravimetria  
 $\sigma$  – Condutividade Elétrica

# SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	20
<b>2. OBJETIVOS</b> .....	22
2.1. Objetivo Geral .....	22
2.2. Objetivos Específicos .....	22
<b>3. REVISÃO DA LITERATURA</b> .....	23
3.1. Leishmaniose .....	23
3.1.1. Grupos Clínicos .....	24
3.1.2. Tratamento .....	26
3.2. Plantas como Fonte de Novos Medicamentos Leishmanicidas .....	29
3.3. Óleos essenciais de <i>Cymbopogon citratus</i> e <i>Cymbopogon nardus</i> .....	33
3.4. Microemulsão .....	34
3.5. Desenvolvimento de Metodologias Analíticas .....	37
3.6. Análise Térmica .....	39
3.7. Cromatografia Gasosa e Cromatografia Líquida de Alta Eficiência .....	40
3.8. Cinética de Liberação .....	42
3.9. Estudos de Citotoxicidade .....	42
<b>4. DESENVOLVIMENTO: MATERIAL, MÉTODOS, RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	45
4.1. Caracterização de derivado naftoquinônico (HBL).....	45
4.1.1. Caracterização de derivados naftoquinônicos com atividade leishmanicida através da análise térmica, dissolução intrínseca e cromatografia líquida. ....	45
4.1.1.1. Introdução.....	45
4.1.1.2. Material e Métodos.....	46
4.1.1.2.1. Amostras.....	46
4.1.1.2.2. Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC).....	47
4.1.1.2.3. Calorimetria Exploratória Diferencial acoplada ao Sistema Fotovisual (DSC Fotovisual).....	47
4.1.1.2.4. Análise Termogravimétrica (TG).....	47
4.1.1.2.5. Estudo de Dissolução Intrínseca.....	48
4.1.1.2.6. Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE).....	49
4.1.1.3. Resultados e Discussão.....	49
4.1.1.3.1. Estudos Térmicos.....	49
4.1.1.3.2. Dissolução Intrínseca.....	53
4.1.1.3.3. Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE).....	53
4.1.1.4. Conclusão.....	56
4.2. Desenvolvimento e Validação.....	59
4.2.1. Desenvolvimento e validação de métodos de quantificação de citral e citronelal em óleos essenciais de <i>Cymbopogon citratus</i> e <i>Cymbopogon nardus</i> isolados e microemulsionados.....	59
4.2.1.1. Introdução.....	59
4.2.1.2. Material e Métodos.....	60
4.2.1.2.1. Material.....	60
4.2.1.2.2. Preparo da Amostra.....	60
4.2.1.2.2.1. Marcador.....	61

4.2.1.2.2.2. Óleos Essenciais e Microemulsões-----	61
4.2.1.2.2.3. Otimização de Métodos Analíticos-----	61
4.2.1.2.2.4. Validação de Métodos Analíticos-----	62
4.2.1.2.2.4.1. Robustez-----	62
4.2.1.2.2.4.2. Linearidade-----	63
4.2.1.2.2.4.3. Especificidade/Seletividade-----	64
4.2.1.2.2.4.4. Limite Inferior de Detecção e Quantificação-----	64
4.2.1.2.2.4.5. Precisão-----	65
4.2.1.2.2.4.6. Exatidão-----	65
4.2.1.3. Resultados e Discussão-----	66
4.2.1.3.1. Otimização da Metodologia Analítica-----	66
4.2.1.3.2. Validação de Métodos Analíticos-----	68
4.2.1.3.2.1. Robustez-----	68
4.2.1.3.2.2. Linearidade-----	70
4.2.1.3.2.3. Especificidade/Seletividade-----	71
4.2.1.3.2.4. Limite inferior de Detecção e Quantificação-----	76
4.2.1.3.2.5. Precisão-----	76
4.2.1.3.2.6. Exatidão-----	78
4.2.1.4. Conclusão-----	79
4.3. Caracterização de Microemulsões-----	83
4.3.1. Caracterização físico-química de Microemulsões de óleos essenciais de <i>Cymbopogon citratus e Cymbopogon nardus</i> -----	83
4.3.1.1. Introdução-----	83
4.3.1.2. Material e Métodos-----	84
4.3.1.2.1. Material-----	84
4.3.1.2.2. Métodos-----	85
4.3.1.2.2.1. Análise da composição química dos óleos essenciais-----	85
4.3.1.2.2.2. Características Físicas-----	85
4.3.1.2.2.3. Determinação do pH-----	85
4.3.1.2.2.4. Determinação da condutividade-----	86
4.3.1.2.2.5. Determinação do tamanho, índice de polidispersão e potencial zeta das gotículas-----	86
4.3.1.2.2.6. Estudos Térmicos-----	87
4.3.1.2.2.7. Avaliação da estabilidade preliminar-----	87
4.3.1.2.2.8. Doseamento dos óleos essenciais nas microemulsões-----	88
4.3.1.2.2.9. Cinética de liberação-----	88
4.3.1.2.2.9.1. Preparo da membrana-----	88
4.3.1.2.2.9.2. Seleção do meio receptor-----	89
4.3.1.2.2.9.3. Montagem das células de Franz-----	89
4.3.1.2.2.9.4. Coleta e quantificação das amostras-----	90
4.3.1.2.2.9.5. Análise da cinética de liberação <i>in vitro</i> -----	90
4.3.1.3. Resultados e Discussão-----	90
4.3.1.3.1. Análise da composição química dos óleos essenciais-----	90
4.3.1.3.2. Características físicas-----	92
4.3.1.3.3. Determinação do pH e condutividade-----	92
4.3.1.3.4. Tamanho, índice de polidispersão e potencial zeta-----	93
4.3.1.3.5. Estudos Térmicos-----	94
4.3.1.3.6. Avaliação da Estabilidade Preliminar-----	95
4.3.1.3.7. Doseamento dos óleos essenciais nas microemulsões-----	96
4.3.1.3.8. Cinética de Liberação-----	96

4.3.1.4. Conclusão-----	100
4.4. Atividade Leishmanicida e Citotoxicidade-----	104
4.4.1. Avaliação da Atividade Leishmanicida e Citotoxicidade de Óleos Essenciais de <i>Cymbopogon citratus</i> e <i>Cymbopogon nardus</i> Isolados e Microemulsionados-----	104
4.4.1.1. Introdução-----	104
4.4.1.2. Material e Métodos-----	105
4.4.1.2.1. Material-----	105
4.4.1.2.2. Preparo da Amostra-----	106
4.4.1.2.3. Atividade Leishmanicida-----	106
4.4.1.2.4. Citotoxicidade-----	107
4.4.1.2.5. Análise Estatística-----	107
4.4.1.3. Resultados e Discussão-----	108
4.4.1.3.1. Atividade Leishmanicida-----	108
4.4.1.3.2. Citotoxicidade-----	110
4.4.1.4. Conclusão-----	112
<b>5. CONSIDERAÇÕES FINAIS-----</b>	<b>115</b>
<b>REFERÊNCIAS-----</b>	<b>116</b>

## 1. INTRODUÇÃO

---

As doenças tropicais negligenciadas (DTN) são consequências marcantes do subdesenvolvimento social, retratando com minúcia a situação das regiões mais pobres e desfavorecidas do planeta (BEYRER et al., 2007). As DTN são endêmicas em várias regiões geográficas importantes (DIAS et al., 2009), afetando milhões de pessoas e determinando altos índices de morbidade e mortalidade. As opções terapêuticas são insuficientes e apresentam uma série de problemas, tais como baixa eficácia, elevada toxicidade e a emergência de cepas resistentes (GUIDO; OLIVA, 2009). Esse cenário é agravado pelo número limitado e pela falta de inovação nos programas de Pesquisa e Desenvolvimento (P&D) tecnológico de fármacos na área de DTN (NWAKA; HUDSON, 2006; NWAKA et al., 2008).

A indústria farmacêutica apresentou, ao longo de sua história, um ritmo acelerado de inovações tecnológicas que resultaram em um fluxo contínuo de novos produtos no mercado. Essas foram quase sempre implementadas por empresas a partir de elevados investimentos em P&D (BASTOS, 2006). No entanto, apenas cerca de 1% desses investimentos são destinados a P&D de fármacos para doenças negligenciadas. O desinteresse da indústria farmacêutica deve-se especialmente ao fato destes medicamentos serem destinados a uma população de baixa renda que não pode arcar com medicamentos de alto custo (GUIDO; OLIVA, 2009; GUIDO 2010).

Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), a leishmaniose enquadra-se nas DTN, sendo destas doenças, a mais negligenciada em termos de desenvolvimento e descoberta de novos medicamentos. Não existe vacina humana e a quimioterapia permanece como a única opção para o controle da infecção, apesar de nenhum fármaco atualmente utilizado ter-se mostrado como uma estratégia de fato efetiva (CAVALLI & BOLOGNESI, 2009).

As plantas têm sido utilizadas para a obtenção de um grande número de substâncias, as quais podem estar relacionadas com um amplo espectro de propriedades biológicas (MELLO et al., 2009), sendo reconhecidas como fonte potencial de novas moléculas antiprotozoário (TIUMAN et al., 2011). Estudos etnobotânicos têm demonstrado o uso popular de plantas no tratamento das leishmanioses tanto por via oral, como na aplicação tópica sobre as lesões cutâneas. Muitos vegetais apresentam em sua composição substâncias das classes dos alcalóides, terpenos, lignanas, quinonas,

flavonóides e lactonas, sesquiterpenos, compostos estes descritos na literatura como eficazes na atividade leishmanicida (BEZERRA et al., 2006).

Entretanto, muitos produtos naturais biologicamente ativos, quando utilizados sem qualquer modificação, não resultam em medicamentos eficazes, por não apresentarem características desejáveis para o uso terapêutico (GRANADA et al., 2007). Diante disto, atenção tem sido dada aos sistemas microemulsionados por sua capacidade em aumentar a eficácia terapêutica de substâncias ativas, permitindo a redução da dose administrada e minimizando os efeitos colaterais potenciais dos fármacos. Estes sistemas são capazes de compartimentalizar fármacos nas gotículas, induzindo modificações nas propriedades biofarmacêuticas dos fármacos incorporados (FORMARIZ, 2004).

Frente às dificuldades encontradas no tratamento das leishmanioses, urge a pesquisa por novos fármacos e/ou a busca de novos tipos de tratamento para todas as formas da doença. Por isso, nas últimas décadas, ênfase tem sido dada ao desenvolvimento de abordagens terapêuticas alternativas, incluindo formulações para o tratamento tópico (BERMAN et al., 2003; GOTO et al., 2010; PHAM et al., 2013). Esse tipo de tratamento pode ser interessante nos casos da doença não disseminada, oferecendo muitas vantagens em comparação ao tratamento convencional, como facilidade de administração do medicamento, menor incidência de efeitos adversos e redução dos custos associados ao tratamento (RODRIGUES, 2012).

Diante do exposto, este trabalho teve o objetivo de desenvolver e validar metodologias analíticas para avaliar a qualidade de matérias-primas e microemulsões com atividade leishmanicida.

## 2. OBJETIVOS

---

A seguir estão descritos os objetivos, geral e específicos, deste trabalho.

### 2.1. Objetivo Geral

Desenvolver e validar metodologias analíticas para avaliar a qualidade de matérias-primas e microemulsões com atividade leishmanicida.

### 2.2. Objetivos Específicos

- Caracterizar nova molécula de derivado naftoquinônico análogo da beta-lapachona com atividade leishmanicida;
- Caracterizar óleos essenciais obtidos a partir das espécies *Cymbopogon citratus* e *Cymbopogon nardus*;
- Caracterizar sistemas microemulsionados obtidos a partir da incorporação dos óleos essenciais *C. citratus* e *C. nardus*;
- Avaliar a atividade leishmanicida e a citotoxicidade dos óleos essenciais de *C. citratus* e *C. nardus*;
- Avaliar a atividade leishmanicida e a citotoxicidade dos sistemas microemulsionados obtidos.

### 3. REVISÃO DA LITERATURA

---

Neste item será apresentada a revisão da literatura dos assuntos pertinentes aos objetivos do estudo.

#### 3.1. Leishmaniose

As doenças tropicais negligenciadas (DTN) são consequências marcantes do subdesenvolvimento social, retratando com minúcia a situação das regiões mais pobres e desfavorecidas do planeta (BEYRER et al., 2007). As DTN são endêmicas em várias regiões geográficas importantes, afetando milhões de pessoas e determinando altos índices de morbidade e mortalidade (DIAS et al., 2009).

A leishmaniose é uma das doenças tropicais mais negligenciadas em termos de descoberta e desenvolvimento de medicamentos (FREITAS-JUNIOR, 2012). São doenças zoonóticas de transmissão vetorial, sendo considerado pela Organização Mundial de Saúde (OMS) um importante problema de saúde pública mundial e representam um complexo de doenças com importante espectro clínico e diversidade epidemiológica (SAPORITO et al., 2013).

Estima-se que 350 milhões de indivíduos estejam expostos ao risco de infecção, com prevalência global de 12 milhões de infectados e incidência de 1,5 a 2 milhões de casos a cada ano (WHO, 2012). Atualmente, a doença afeta 88 países, 72 dos quais são subdesenvolvidos, estimando-se 59 mil óbitos, número este que, no caso de doenças parasitárias, só é superado pelas mortes causadas por malária. Embora o panorama seja preocupante, as leishmanioses ainda ocupam posição de destaque no ranking das doenças negligenciadas, sendo categorizadas pela OMS como doenças emergentes que apresentam medidas de controle ainda inadequadas (WHO 2010; 2012).

As leishmanioses humanas constituem um complexo de enfermidades que acometem vísceras e pele, apresentando amplo espectro clínico que dependem da espécie do parasito que foi inoculado pelo vetor e da resposta imune do hospedeiro vertebrado acometido (SANTOS et al, 2008). As manifestações clínicas variam desde úlceras cutâneas localizadas à doença sistêmica fatal (WHO 2010).

Os seus agentes etiológicos são protozoários tripanosomatídeos do gênero *Leishmania*, parasita intracelular obrigatório das células do sistema fagocitário mononuclear, com uma forma flagelada ou promastigota, encontrada no tubo digestivo do inseto vetor e outra aflagelada ou amastigota nos tecidos dos vertebrados (BRASIL,

2006). No Brasil, as espécies mais importantes são *Leishmania amazonensis*, *Leishmania guyanensis*, *Leishmania braziliensis* e *Leishmania chagasi* (RAMOS E SILVA; JACQUES, 2002; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2006; WHO 2010). Embora algumas manifestações clínicas estejam mais frequentemente associada a uma determinada espécie ou subgênero, nenhuma é única para uma espécie (WHO, 2010).

### 3.1.1. Grupos Clínicos

A Organização Mundial da Saúde divide e reconhece as leishmanioses em quatro grupos clínicos: leishmaniose cutânea localizada, cutânea difusa, mucocutânea e visceral.

A leishmaniose cutânea localizada (LCL) é a forma mais prevalente da doença, causada principalmente pelas espécies dermatrópicas de *Leishmania* (GOTO et al, 2010; HAJJARAN et al, 2013). As lesões usualmente são encontradas em partes expostas da superfície corporal como mãos, rosto ou pernas (NAKKASH-CHMAISSE et al, 2011). A LCL tem como seu primeiro sinal um pequeno eritema inchado e avermelhado que se desenvolve após um período variável no local da inoculação. O eritema se desenvolve em uma pápula e, em seguida, como um nódulo que, progressivamente úlcera em um período de duas semanas a seis meses, transformando-se em uma lesão característica da LCL (BLUM et al, 2004). Neste tipo de manifestação, a cura pode ocorrer espontaneamente, deixando o local da lesão hipopigmentado e com uma cicatriz lisa e fina. De acordo com o tipo de parasito e hospedeiro, alguns casos evoluem para outras formas da doença (BAILEY et al, 2007) (Figura 1-1).

A leishmaniose cutânea difusa (LCD) constitui uma forma clínica rara, porém grave, que ocorre em pacientes com anergia e deficiência específica na resposta imune celular a antígenos de *Leishmania*. Inicia-se com uma lesão única que evolui de forma lenta com formação de placas e múltiplas nodulações não ulceradas disseminadas pelo corpo (BAILEY et al, 2007; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2007). As lesões apresentam tipicamente uma grande quantidade de parasitos (GOTO et al, 2010) (Figura 1-2).

A leishmaniose mucocutânea (LMC) é caracterizada pela destruição das cavidades oral, nasal e faríngea, frequentemente envolvendo lesões desfigurantes. Sua forma clássica é secundária à lesão cutânea. Na maioria dos casos, a LMC resulta da LCL de evolução crônica e curada sem tratamento ou com tratamento inadequado (GOTO et al., 2010). A progressão clínica para LMC depende de uma combinação entre a imunidade

celular do hospedeiro e a virulência do parasito (DAVID et al., 2009). Esta forma ocorre devido à disseminação linfática ou hematogênica de amastigotas da pele para a mucosa nasal, orofaringe, palatos, lábios, língua, laringe e, excepcionalmente, traquéia e árvore respiratória superior (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2007) (Figura 1-3).

A leishmaniose visceral (LV) ou calazar é a forma mais grave da doença, quase sempre fatal, se não tratada. Após vários meses de incubação a LV se manifesta com febre intermitente, perda de peso, hepatoesplenomegalia e progressiva deterioração do hospedeiro (MALTEZOU, 2010). A doença pode acometer os linfonodos, baço, fígado e medula óssea. Inchaço nos linfonodos, baço e fígado são visualizados após poucas semanas. Devido ao envolvimento do sistema hematopoiético na medula óssea, os pacientes são acometidos por anemia severa, leucopenia e trombocitopenia, levando a complicações, tais como maior susceptibilidade a infecções e tendência a sangramentos (NEUBER, 2008). A lesão cutânea inicial é semelhante a lesão da inoculação do parasito na leishmaniose cutânea localizada. Posteriormente, outras lesões dermatológicas podem ser observadas, tais como pápulas ou eritematosas, nódulos, ulcerações, máculas hipocrômicas, icterícia, púrpura, xerose e alterações decorrentes da desnutrição do paciente, tais como cabelos sem brilho, finos e quebradiços, acompanhada ou não de alopecia (DIÓGENES & COELHO, 1997; TORRES et al, 2012) (Figura 1-4).

**Figura 1** – Fotos das manifestações clínicas da leishmaniose. (1) Cutânea localizada; (2) Cutânea difusa; (3) Mucocutânea; (4) Visceral.



Fonte: An. Bras. Dermatol. vol.81 no.3 Rio de Janeiro June 2006 (Foto 1, 3 e 4) e Ministério da Saúde 2006 (Foto 2).

### 3.1.2. Tratamento

As opções terapêuticas utilizadas para o controle das leishmanioses estão associadas a diversos problemas, como baixa eficácia, alta toxicidade, dificuldade de administração, altos custos e crescente resistência (FREITAS-JUNIOR, 2012). Apesar das diferenças existentes entre as várias espécies de *Leishmania* à suscetibilidade a fármacos e às várias formas de manifestação da doença, os medicamentos usualmente empregados nos tratamentos são os mesmos para as várias formas da doença (GOTO et al, 2010).

Historicamente, a quimioterapia da leishmaniose foi baseada no uso de antimonial pentavalente. Para todas as formas clínicas da leishmaniose, os antimoniais são os fármacos mais amplamente usados no tratamento, que está baseado, principalmente, na quimioterapia. No Brasil, o medicamento à base de antimônio, utilizado como primeira escolha na terapêutica da leishmaniose, é o antimoniato de metilglucamina. Estes medicamentos são bastante eficazes, porém, frequentemente, produzem reações adversas que vão desde dor no local da injeção, febre, mialgias e artralgias, até efeitos colaterais potencialmente graves, como toxicidade hepatocelular, arritmias e pancreatites. Dentre todos os efeitos colaterais, o mais grave é aquele que incide sobre o sistema cardiovascular. Este efeito é diretamente relacionado com idade do paciente, com a dose e com o tempo de tratamento, devendo ser acompanhado periodicamente por eletrocardiograma. Por essas razões, o uso dos antimoniais é contra-indicado em pacientes com algumas doenças crônicas, grávidas e indivíduos acima de 60 anos (GOTO et al., 2010).

Além dos graves efeitos colaterais associados ao uso dos antimoniais pentavalentes, outro problema surge diante do expressivo aumento da quantidade relatada de falhas terapêuticas. Apesar da resposta terapêutica aos antimoniais ser geralmente favorável, há relatos de fracasso terapêutico em algumas situações, especialmente em pacientes com leishmaniose visceral e mucocutânea, tornando-se grave problema nas áreas endêmicas da doença (ALVAR et al., 2007; SUNDAR, 2001). Esses dados sugerem que cepas de *Leishmania* resistentes ao Sb(V) podem ser selecionadas pelos longos anos de uso destes antimoniais (TIUMAN et al., 2011).

Além dos antimoniais, outras drogas têm sido empregadas no tratamento das diversas formas da leishmaniose, entre as quais se destacam a anfotericina B, pentamidina, paromomicina e o miltefosina (TIUMAN et al., 2011).

A anfotericina B é um antibiótico e antifúngico poliênico e novas formulações lipídicas, menos tóxicas e mais efetivas, contendo anfotericina B foram desenvolvidas. Essas formulações incluem a anfotericina B lipossomal (L-AmB: Ambisome<sup>®</sup>), dispersão coloidal de anfotericina B (ABCD: Anfocil<sup>®</sup>) e complexo lipídico de anfotericina B (ABL: Abelcet<sup>®</sup>) (MISHRA et al., 2009; SINGH et al., 2009). Formulações lipossomais de anfotericina B constituem o tratamento de primeira escolha em países endêmicos no sul da Europa e em outros países desenvolvidos. Entretanto, essas formulações apresentam um alto custo, dificultando sua utilização em países pobres, nos quais a escolha do tratamento depende mais do custo do que da eficácia ou toxicidade (MALTEZOU, 2010).

A pentamidina é utilizada no tratamento de pacientes com leishmaniose visceral resistentes aos antimoniais (PISCOPO et al., 2006) e no tratamento da leishmaniose cutânea e mucocutânea em algumas regiões do Novo Mundo (GOTO et al., 2010), podendo ser utilizada também como o medicamento de primeira escolha (DAVID et al., 2009). Casos de resistência à pentamidina também tem sido relatados (BRAY et al., 2003). Dessa forma, quando o paciente apresenta resistência ao tratamento, ou quando os efeitos adversos desencadeados pelos medicamentos de primeira escolha tornam-se severos, medicamentos leishmanicidas de segunda escolha devem ser indicados. Outro problema a ser mencionado quanto ao tratamento com anfotericina B e pentamidina é a questão da via de administração, estes são administrados apenas por via parenteral, além de apresentar sérios efeitos adversos (PHAM, LOISEAU; BARRAT, 2013).

A paromomicina é um aminoglicosídeo que tem sido utilizada por aplicação oral e parenteral no tratamento da leishmaniose cutânea no Novo e Velho Mundo. Quando associada com cloreto de metilbenzetônio, o uso tópico da paromomicina foi eficaz no tratamento da leishmaniose cutânea do Velho Mundo. Quando aplicada de maneira parenteral, a paromomicina também se mostrou efetiva no tratamento da leishmaniose cutânea localizada do Novo Mundo (GOTO et al., 2010). A combinação de paromomicina e estibogluconato tem sido também utilizada para o tratamento da doença cutâneo difusa. Entretanto, sua utilização tem sido limitada pelos seus efeitos colaterais, como toxicidade renal e ao oitavo nervo craniano (SINGH et al., 2004).

O principal avanço no tratamento da leishmaniose nos últimos anos ocorreu com a descoberta do efeito terapêutico da hexadecilfosfocolina (miltefosina), originalmente desenvolvida como um agente antitumoral. A miltefosina é o mais recente fármaco leishmanicida disponibilizado no mercado e se caracteriza como o primeiro fármaco de

administração oral utilizado no tratamento da leishmaniose. Os problemas relacionados à ampla utilização da miltefosina incluem seu potencial teratogênico e a ocorrência de resistência. A resistência à miltefosina pode aparecer facilmente durante o tratamento devido a mutações pontuais, que levam a diminuição no acúmulo do composto no interior da célula (MALTEZOU, 2010). Além disso, a miltefosina desencadeia efeitos colaterais adversos durante o tratamento, como náuseas, vômitos, enjoos, dores de cabeça e diarreia. Ressalta-se ainda, o alto custo deste composto como um fator que limita sua utilização (MISHRA et al, 2009; SINGH et al, 2009).

Diversas substâncias estão sendo testadas como quimioterápicos antileishmanioses, sendo que as principais estão direcionadas para a inibição de vias metabólicas vitais e específicas do parasita. Dentre as vias potenciais estudadas para a ação de fármacos leishmanicidas, existe a via do óxido nítrico. Com a verificação da produção de óxido nítrico por *L. amazonensis*, testes vêm sendo realizados à procura de fármacos que atuem inibindo essa produção. Os dados indicam a existência de verdadeiro *cross-talk* envolvendo a óxido nítrico sintase (NOS) para que o parasita se proteja do ambiente inóspito do macrófago (GENESTRA et al., 2003).

Além dessa abordagem terapêutica, a combinação de drogas também tem se mostrado uma alternativa promissora no tratamento das leishmanioses por apresentar as seguintes vantagens: (i) aumentar a atividade antileishmania através do uso de compostos com atividade sinérgica ou aditiva, (ii) evitar o surgimento da resistência aos fármacos, (iii) uso de doses menores, reduzindo as chances de efeitos colaterais tóxicos, (iv) e redução, também, dos custos (CROFT et al., 2006).

Essa alternativa já foi investigada para a associação entre a paramomicina e o antimoniato de meglumina em pacientes predominantemente infectados com *L. panamensis*. A eficácia da combinação da pomada de paramomicina com 20mg Sb(V)/Kg/dia, durante 7 dias, foi de 90%. A redução do tempo de tratamento com antimônio buscava reduzir a incidência das reações adversas relacionadas ao fármaco. No entanto, 25% dos pacientes relataram reação adversa no local de aplicação da pomada (SOTO et al., 1995).

Frente às dificuldades encontradas no tratamento das leishmanioses, urge a pesquisa por novos fármacos e/ou a busca de novos tipos de tratamento para todas as formas da doença. Por isso, nas últimas décadas, ênfase tem sido dada ao desenvolvimento de abordagens terapêuticas alternativas, incluindo formulações para o tratamento tópico (BERMAN et al., 2003; GOTO et al., 2010; PHAM et al., 2013). Esse

tipo de tratamento pode ser interessante nos casos de doença não disseminada, oferecendo muitas vantagens em comparação ao tratamento convencional, como facilidade de administração do medicamento, menor incidência de efeitos adversos e redução dos custos associados ao tratamento (RODRIGUES, 2012).

### **3.2. Plantas como Fonte de Novos Medicamentos Leishmanicidas**

O Brasil é o país com a maior biodiversidade do mundo, contando com um número estimado de mais de 20% do número total de espécies do planeta. O país possui a mais diversa flora, número superior a 55 mil espécies descritas, o que corresponde a 22% do total mundial (BRASIL, 2006). Esta rica biodiversidade é acompanhada por uma longa aceitação de uso de plantas medicinais e conhecimento tradicional associado (RODRIGUES, 2006).

As práticas terapêuticas utilizando as plantas medicinais sempre exerceram importante papel na busca de melhores condições de saúde pelo homem. De acordo com a OMS, as plantas medicinais são todas aquelas, silvestres ou cultivadas, que são utilizadas como recurso para prevenir, aliviar, curar e modificar um processo fisiológico normal ou patológico, e ainda como fonte de fármacos e de seus precursores (SANTOS et al., 2011; DUTRA et al., 2009; BRAGA, 2008).

A utilização de produtos naturais com propriedades terapêuticas representa a forma mais antiga e difundida de medicação (HALBERSTEIN, 2005). As observações populares sobre o uso e a eficácia de plantas medicinais contribuem de forma relevante para a divulgação das atividades terapêuticas dos vegetais, prescritos com frequência, pelos efeitos medicinais que produzem, apesar de não terem seus constituintes químicos conhecidos (SANTOS et al., 2008).

A importância das plantas medicinais para a investigação farmacológica e desenvolvimento de medicamentos, deve ser considerada sob duas perspectivas relevantes: o uso dos constituintes das plantas como matéria-prima, ponto de partida para a síntese de novas moléculas e, como recurso natural, potencialmente ativo, diretamente como agentes terapêuticos (NEGI, 2012).

Os metabólitos secundários produzidos por plantas tiveram um papel fundamental no desenvolvimento da química orgânica sintética moderna. Historicamente, o desenvolvimento da química orgânica ocorreu paralelamente ao estudo de plantas, principalmente a partir do século XIX, quando foram registrados os primeiros estudos

sobre plantas, com base científica. Isso resultou no isolamento de alguns princípios ativos de plantas, já então conhecidas como medicinais. Desses estudos foram obtidas algumas substâncias que se consagraram como princípios ativos eficazes, e que até hoje, ainda são muito empregados no tratamento de certas doenças, a exemplo de morfina, quinina, cânfora e cocaína (MOLTANARI; BOLZANI, 2001).

Muitas substâncias derivadas de plantas são fontes atraentes para o desenvolvimento de novos agentes terapêuticos (REICHLING et al., 2009). Nos últimos anos intensificou-se o interesse nestas substâncias, não só devido à sua importância nos processos bioquímicos vitais, como também ao destaque cada vez maior na imensa atividade farmacológica que possuem (SIMÕES et al., 2007; PEREIRA; CARDOSO, 2012).

Avanços consideráveis foram obtidos na área de produtos naturais, utilizando a estratégia de síntese associada ao crescente entendimento das rotas bioquímicas e terapêuticas (KLEIN et al., 2009). Estruturas encontradas na natureza como as quinonas motivaram muitos pesquisadores na busca de novos fármacos que sejam menos tóxicos aos seres humanos e também efetivos para o tratamento de uma variedade de doenças (SILVA; FERREIRA; SOUZA, 2003).

As quinonas representam uma ampla e diversificada família de metabólitos secundários. A  $\beta$ -lapachona é uma naftoquinona natural facilmente obtida a partir do lapachol. Devido à sua importância farmacológica, a sua fácil obtenção a partir de fontes naturais e, mais recentemente, ao desenvolvimento de novas rotas sintéticas, a  $\beta$ -lapachona se tornou uma estrutura privilegiada para a química medicinal (FERREIRA, 2010).

Muitas outras atividades farmacológicas foram atribuídas a  $\beta$ -lapachona semi-sintética, tais como atividade antimicrobiana e antifúngica; atividade cercaricida (prevenção da penetração de cercarias na pele); ação moluscicida (atividade contra caramujos *Biomphalaria glabrata*, hospedeiro intermediário do *Schistosoma mansoni*); leishmanicida (ação intracelular nas formas amastigotas de *L. braziliensis*); tripanossomicida (atividade contra o *Trypanosoma cruzi*, agente causador da doença de Chagas em sua fase tripomastigota); antimalárico (atividade contra eritrócitos parasitados por *Plasmodium falciparum*); anti-inflamatória; antineoplásica; antiulcerantes; e, uso contra enterovirose (DA SILVA, 2003). Na busca por atividades biológicas potenciais, tendo a  $\beta$ -lapachona como protótipo, diversos análogos sintéticos

foram obtidos (PINTO et al., 2000; DI CHENA 2001; JORQUEIRA et al., 2006; FERREIRA et al., 2006; SILVA et al., 2009).

Rocha (2006) demonstrou pela primeira vez a potente atividade leishmanicida de derivados naftoquinônicos naturais modificados análogos da  $\beta$ -lapachona, contra as células promastigotas da *L. chagasi* quando comparado ao padrão anfotericina B. O estudo contribuiu para o descobrimento de novas moléculas com atividade leishmanicida, despertando o interesse pela molécula homo-betalapachona (HBL) que apresentou CE50 de  $2,0 \times 10^{-5}$  M/h e melhor rendimento entre as moléculas estudadas. A propriedade intelectual deste trabalho foi preservada em forma de patente.

Apesar dos avanços na síntese de novos fármacos, com aumento das alternativas terapêuticas disponíveis, os produtos naturais e derivados foram, e continuam sendo, notoriamente, de importância crucial em determinados setores de uma sociedade moderna, mesmo considerando-se o grande número de produtos produzidos por síntese (MOLTANARI; BOLZANI, 2001).

Os medicamentos obtidos através de derivados das plantas podem ser tão eficazes quanto os medicamentos produzidos com ativos oriundos de síntese química, por isso a transformação de uma planta em um medicamento deve priorizar a preservação da integridade química dos princípios ativos e, por consequência, a ação farmacológica do vegetal, garantindo a constância da ação biológica desejada (PEREIRA; CARDOSO, 2012).

Os óleos essenciais são metabólitos secundários produzidos pelas plantas medicinais e que podem ser os responsáveis por suas atividades biológicas. Dentre eles tem-se, por exemplo, um grupo de substâncias terpenóides extensamente estudado. Atualmente aproximadamente 3000 óleos essenciais são conhecidos, 300 dos quais são comercialmente importantes, especialmente para a indústria farmacêutica (BAKKALI et al., 2008).

Os óleos essenciais são misturas naturais muito complexos que pode conter cerca de 20-60 componentes em diferentes concentrações. Eles são caracterizados por dois ou três principais componentes em concentrações bastante elevadas (20-70%) em comparação para outros componentes presentes em quantidades vestigiais. Este grande número de compostos químicos presentes nos óleos essenciais apresentam inúmeras atividades biológicas, avaliadas em vários estudos, como: anti-inflamatória, pesticida, inseticida, moluscicida, larvicida, carrapaticida, antioxidante, antisséptica, herbicida, entre outras (SILVA, 2003; HAJHASHEMI et al., 2003, PERRY et al., 2003).

Os derivados de plantas com atividade leishmanicida para várias formas de *Leishmania* tem sido amplamente estudados. O extrato alcaloídico bruto das cascas do caule de *Zanthoxylum chiloperone* exibiu atividade *in vitro* contra várias cepas de *Leishmania* ssp. a 100 µg/mL (FERREIRA et al., 2002).

Plock et al. (2001) realizaram uma triagem preliminar de extratos de 50 plantas diferentes para suas possíveis atividades leishmanicidas contra as formas promastigotas de *Leishmania amazonensis*, oito extratos apresentaram um mínimo de inibição de 50% a 100 µg/mL. Muitos dos estudos relacionados com atividade antileishmania de produtos naturais tiveram origem em estudos etnofarmacológicos.

A espécie vegetal *Chenopodium ambrosioides*, por exemplo, utilizada no nordeste do Brasil no tratamento de úlceras leishmanióticas, teve recentemente sua ação leishmanicida comprovada por grupos de pesquisa do Brasil e de Cuba (FRANÇA et al., 1996).

Monzote et al. (2007) examinaram a atividade do óleo essencial do *Chenopodium ambrosioides* sobre a *L. amazonensis*, quando administrado via intraperitoneal e oral em relação à droga de referência, a anfotericina B, confirmando boa atividade contra as formas amastigota e promastigota do parasito.

Ueda-Nakamura et al. (2006) demonstraram a atividade leishmanicida do óleo essencial de *Ocimum gratissimum* L., bem como de seu principal constituinte, o eugenol.

Orhan et al. (2006) em estudo, utilizaram das folhas, caule e sementes da *Pistacia vera* para extração do óleo essencial, que é lipofílico e com boa atividade sobre a forma amastigota da *L. donovani*.

Entretanto, muitos produtos naturais biologicamente ativos, quando utilizados sem qualquer modificação, não resultam em medicamentos eficazes, por não apresentarem características desejáveis para uso terapêutico. Em muitos casos, o fracasso da utilização de fármacos de origem natural é atribuído à baixa concentração que alcança os alvos terapêuticos (GRANADA et al., 2007).

Uma estratégia importante na obtenção de novos medicamentos, a partir de derivados de plantas, consiste na melhoria das propriedades terapêuticas desses compostos através da incorporação em sistemas de liberação. Os sistemas de liberação de fármacos apresentam inúmeras vantagens, entre elas a capacidade de prolongar e controlar a liberação da substância ativa, proteger as moléculas contra degradação no

meio fisiológico, veicular fármacos hidrofóbicos e conduzir à redução dos efeitos colaterais indesejáveis (FONSECA et al., 2002; GUPTE; CIFTCI, 2004).

### 3.3. Óleos Essenciais de *Cymbopogon citratus* e *Cymbopogon nardus*

Os óleos essenciais do gênero *Cymbopogon* e seus componentes são conhecidos por sua atividade antimicrobiana (PATTNAIK et al., 1995; BILLERBECK et al., 2001), anti-helmíntico (NIRMAL et al., 2007), antiparasitários (GEORGE et al., 2010), anti-inflamatórios (FRANCISCO et al., 2011), anticonsulvante (SILVA et al., 2010) e atividade antioxidante (RUBERTO; BARATTA, 2000; HIERRO et al., 2004; KHUNKITTI, 2010). Dentro deste gênero, destacam-se pelo grande uso na medicina popular e teor de óleos essenciais as espécies *Cymbopogon citratus* e *Cymbopogon nardus*.

O *C. citratus* é uma espécie vegetal originária da Índia e amplamente distribuída por vários países tropicais, entre eles o Brasil, onde assume diferentes denominações populares conforme a região em que se encontra: capim-limão, capim-santo, erva-cidreira, capim-catinga, capim-de-cheiro, capim-cidrão, capim-cidilho e capim-cidro (COSTA et al., 2005).

O componente mais importante do óleo essencial do *C. citratus* é o citral (47 a 85%). O citral é constituído de uma mistura de isômeros, geranial ( $\alpha$ -citral) e neral ( $\beta$ -citral), e é utilizado pela indústria farmacêutica para a síntese de vitamina A e  $\beta$ -caroteno (SIDIBE et al., 2001).

Dentre as atividades biológicas registradas da espécie *C. citratus* destacam-se: efeito hipotensor e anti-inflamatório da infusão da suas folhas, testado em ratos por Viana et al. (2000); ação fungicida do óleo essencial obtido das suas folhas contra *Aspergillus niger*, avaliado por Baratta et al. (1998); bem como ação antibacteriana contra organismos Gram-positivos e Gram-negativos observado por Onawunmi & Ogunlana (1984). Lavabre (1997) cita como ações farmacológicas reconhecidas do óleo essencial de *C. citratus*: anti-hipertensivo, antiespasmódico, antiasmático, antisséptico, antiparasitário, antitérmico, antirreumático, miorrelexante e repelente para insetos.

Luize et al. (2005) avaliaram a atividade leishmanicida de 19 extratos de plantas, dentre eles o extrato de *C. citratus*, concluindo a potente atividade deste extrato contra as formas *L. amazonensis*.

Machado et al. (2010; 2012) avaliaram a atividade leishmanicida de óleos essenciais extraídos de partes aéreas de 20 espécies distintas de plantas, contra a forma promastigota *Leishmania infantum*, evidenciando boa atividade e ausência de toxicidade em células endoteliais de mamíferos para o óleo essencial *C. citratus*.

O *C. nardus* conhecido vulgarmente como capim citronela, é uma planta originada do Ceilão e da Índia, e cultivada em regiões tropicais e subtropicais (CASTRO; RAMOS, 2003). O óleo essencial extraído de *C. nardus* possui alto teor de geraniol e citronelal.

O óleo apresenta atividade repelente a insetos, ação fungicida e bactericida (SATO et al., 2006; KORDALI et al., 2007), além de ser utilizado na fabricação de perfumes e cosméticos (BILLERBECK et al., 2001; MUMCUOGLU et al., 2004; TRONGTOKIT et al., 2005; WONG et al., 2005; REIS et al., 2006).

O citronelal é utilizado na síntese de importantes compostos químicos, a exemplo das iononas e vitamina A, e diversos estudos relataram diferentes atividades biológicas: antioxidante (SINGH et al., 2012), antibacteriana (ELAISSI et al., 2011) e efeito antinociceptivo (QUITANS-JÚNIOR et al., 2011).

Em se tratando de comprovações da atividade leishmanicida tanto do óleo de *C. nardus* quanto do citronelal os estudos ainda são insuficientes.

Estudos que evidenciam os mecanismos de ação dos óleos essenciais são mínimos. De um modo geral, a complexidade da composição química da maioria dos óleos confere-lhes baixa especificidade. A atividade biológica não é atribuída a um único mecanismo de ação, uma vez que a grande variedade de grupos químicos presentes permite que haja vários alvos na célula (BAKKALI et al., 2008).

### **3.4. Microemulsão**

A nanotecnologia pode ser definida como a área da ciência que envolve a criação, caracterização e a utilização de materiais, dispositivos ou sistemas em escala nanométrica (KOO; RUBINSTEIN; ONYUKSEL, 2005; NAYAK; DHARA, 2010). Aplicada a sistemas de liberação de fármacos consiste na compartimentalização de fármacos em estruturas de escala nanométrica, em torno de 1 a 300 nm, com o intuito de otimizar as propriedades farmacocinéticas e farmacodinâmicas, promovendo ainda, maior estabilidade aos fármacos, maior eficácia, direcionamento ao sítio de ação, bem

como o aumento da segurança e adesão do paciente (TOLL, 2004; RUENRAROENGSACK; COOK; FLORENCE, 2010).

As microemulsões (ME) são definidas como sistemas termodinamicamente estáveis, isotrópicos, transparentes, de dois líquidos imiscíveis, usualmente água e óleo, estabilizados por um filme de compostos tensoativos localizados na interface óleo/água (FORMARIZ, 2005). São capazes de compartimentalizar fármacos nas gotículas da fase interna, as quais possuem propriedades físico-químicas bastante diferentes das do meio dispersante, induzindo modificações nas propriedades biológicas dos fármacos incorporados (LAWRENCE; REES, 2000; FORMARIZ et al., 2005). Desta forma, modulam o perfil de biodisponibilidade alterando a constante de ionização do fármaco a fim de disponibilizá-lo em sua forma mais absorvível (não ionizada), além de poder controlar a velocidade de liberação, servindo como sistemas reservatórios de fármacos sem alterar a estrutura química da molécula transportada (OLIVEIRA et al., 2004).

Como veículos de administração tópica de fármacos, as ME apresentam propriedades e vantagens peculiares por apresentarem excelente taxa de penetração em camadas profundas do estrato córneo quando comparadas a formulações convencionais, sendo consideradas como sistema terapêutico nanotecnológico bastante promissor na permeação e direcionamento eficiente de fármacos através da pele (GRAMPUROHIT, RAVIKUMAR; MALLYA, 2009; SILVA et al., 2010).

As microemulsões também apresentam a vantagem de aumentar a biodisponibilidade de certos fármacos, seja através da solubilização de fármacos pouco solúveis (KAWAKAMI et al., 2002), ou pela proteção contra a hidrólise enzimática (LYONS et al., 2000), possibilitando a redução de dose administrada, garantindo além de vantagens econômicas, a diminuição de possíveis efeitos adversos. Adicionalmente, as microemulsões podem atuar ainda como um sistema reservatório para o fármaco, garantindo a sua liberação lenta e a prolongação do seu efeito farmacológico (DALMORA et al., 2001).

Sistemas microemulsionados são formados a partir da combinação de três a cinco componentes, tais como, tensoativo, fase aquosa, fase oleosa e, quando necessário, o cotensoativo. A mistura destes constituintes é capaz de formar uma extensa variedade de estruturas e fases. Além das microemulsões, podem também existir emulsões, fases cúbicas ou hexagonais cristalinas e estruturas lamelares (DAMASCENO, 2011).

A relação entre a composição dos constituintes e as estruturas formadas pode ser visualizada com o auxílio de um diagrama de fases. O diagrama pode ser classificado

como pseudoternário, ternário ou quaternário, de acordo com o tipo e o número de componentes utilizados na sua elaboração (ROSSI et al., 2007). O diagrama de fases descreve em que condição experimental é possível se obter microemulsões e as regiões limites de transição entre emulsões, fases separadas e microemulsões O/A, A/O e bicontínuas (SILVA et al., 2009).

É essencial para o desenvolvimento de ME que os componentes escolhidos sejam farmacêuticamente aceitáveis. Em alguns casos, para que as mesmas sejam obtidas são necessárias grandes quantidades de tensoativos, que nessas condições podem gerar efeitos tóxicos e elevar o valor da formulação (FORMARIZ, 2005).

Os tensoativos de escolha para uso farmacêutico são os não iônicos e/ou anfotéricos. Estes são particularmente usados por apresentarem baixa toxicidade às membranas celulares, baixa irritabilidade, elevada estabilidade química e por promoverem uma grande permeabilidade do fármaco pela pele (CONSTANTINIDES et al., 1995). As lecitinas são tensoativos anfotéricos de ocorrência natural, biologicamente atóxico sendo largamente empregados em microemulsões farmacêuticas (MORENO et al., 2003; CHANGEZ et al., 2006). Os tensoativos não-iônicos, por sua vez, podem ser utilizados com alternativas as lecitinas, já que apresentam baixa toxicidade em concentrações moderadas. Dentre eles destaca-se o Labrasol<sup>®</sup>, amplamente empregado em microemulsões para uso tópico (CHEN et al., 2004; SINTOV; SHAPIRO, 2004).

Em algumas formulações são necessários à presença de um cotensoativo. O uso deste constituinte pode facilitar a solubilização de fármacos lipofílicos em microemulsões do tipo O/A, uma vez que torna o meio mais hidrofóbico a partir da diminuição da constante dielétrica da água (NARANG et al., 2007). No entanto a presença do cotensoativo pode resultar no aumento significativo da toxicidade da formulação. Alguns cotensoativos apresentam uma toxicidade mais tolerável (ALANY et al., 2006; CHEN et al., 2004) como os poligliceróis comerciais Plurol<sup>®</sup> Oleique (DJORDJVIC et al., 2005) e Plurol<sup>®</sup> Isostearique (EXPOSITO et al., 2003).

A fase oleosa é de fundamental importância tanto na formação da microemulsão como na solubilização do fármaco. A maioria dos óleos utilizados nas microemulsões para uso farmacêutico são volumosos e semi-polares, assim, os ésteres de ácido graxo, como o miristato de isopropila (MORENO et al., 2003) são farmacêuticamente aceitáveis e bastante utilizados. A fase aquosa em microemulsões para uso farmacêutico deve estar livre de contaminantes, sendo utilizado geralmente água bidestilada, deionizada ou ultra-pura, além de soluções salinas NaCl a 0,9%. Esta fase pode conter

aditivos como tampões, promotores de permeação dérmica e conservantes, que podem influenciar na região da microemulsão e na solubilização do fármaco (CORREA et al., 2005).

As formas farmacêuticas devem ser projetadas para ceder ao fármaco a melhor resposta terapêutica possível, a partir da via de administração selecionada (AULTON, 2005). Para o tratamento das manifestações cutâneas da leishmaniose não disseminada, que apresenta seu agente patológico e lesões localizados na pele, a administração tópica possui vantagens como: manutenção da eficácia com menor dose diária do ativo; redução dos efeitos adversos indesejados; direcionamento do fármaco diretamente ao sítio de ação; e maior adesão pelo paciente. Estes fatores credenciam a administração tópica como uma via alternativa adequada ao tratamento desta infecção.

### **3.5. Desenvolvimento de Metodologias Analíticas**

O processo de descoberta de novos fármacos e desenvolvimento de novos medicamentos caracterizam-se por sua complexidade, fruto de multiplicidade de fatores que envolvem o planejamento molecular de novas estruturas capazes de apresentarem os efeitos farmacológicos desejados, com biodisponibilidade adequada ao seu emprego terapêutico e seguro (BARREIRO, 2002).

O primeiro passo do desenvolvimento de uma formulação implicam estudos para reunir informações básicas sobre as características físicas e químicas do fármaco a ser utilizado em uma forma farmacêutica. Os estudos compreendem a etapa anterior ao planejamento da forma farmacêutica, de modo que as informações obtidas por meio desta prática possibilitem uma abordagem racional ao desenvolvimento da mesma (ALLEN JR. et al., 2007).

Com a finalidade de controlar a qualidade de todas as etapas do processo de desenvolvimento de um novo medicamento, novos métodos analíticos que resultem em respostas rápidas, precisas e, com baixo custo, é fundamental. Com isso, surge a necessidade de desenvolver métodos analíticos cada vez mais seletivos e sensíveis, sobretudo quando métodos oficiais inexistem. Neste ponto, as ciências analíticas desempenham um papel fundamental no tocante ao estabelecimento de protocolos analíticos compreendendo desde o preparo da amostra até identificação e quantificação das espécies de interesse (RAO; NAGARUJU, 2003).

A caracterização de novas moléculas sintéticas deve envolver estudos para determinar especificações que contemplem características intrínsecas das moléculas, como identificação, pureza, solubilidade, ponto de fusão, relacionadas ao processo de síntese ou alterações decorrente das condições empregadas na síntese e purificação da substância, dependendo do solvente utilizado e da temperatura de reação, conforme a rota adotada pelo fabricante (MAXIMINIANO, 2010).

Na caracterização de produtos vegetais encontram-se dificuldades inerentes à sua própria origem, devido principalmente, a complexidade de sua composição e a variabilidade na qualidade das drogas obtidas a partir de uma mesma espécie vegetal (HERNÁNDEZ et al., 2013). Tal característica está relacionada com os fatores referentes às condições do local de plantio, processo de coleta, manuseio e processamento da matéria-prima. Desta forma, as drogas vegetais apresentam, frequentemente, variações justificando a necessidade da padronização desses produtos (KLEIN et al., 2009).

A padronização de matérias-primas vegetais e a garantia da sua eficácia e segurança requerem métodos analíticos adequados para a detecção e quantificação de seus marcadores e de substâncias potencialmente tóxicas (CHABARIBERI et al., 2008). O controle de qualidade, a padronização e a estabilidade dos medicamentos de origem vegetal constituem uma tarefa bastante complexa, embora atualmente possível, em função dos avanços crescentes alcançados nos métodos analíticos de alta resolução. Essas técnicas permitem o isolamento e a identificação dos constituintes químicos presentes em baixíssimas concentrações nas plantas (SIANI, 2003).

Portanto, o desenvolvimento de métodos para quantificação dos componentes ou marcadores de fitoterápicos tem sido acompanhado do processo de validação a fim de disponibilizar uma metodologia alternativa para análises descritas em Farmacopeias ou oferecer uma proposta para quantificação de produtos caracterizados pela ausência de metodologias analíticas (COSTA, 2008).

Um processo de validação bem definido e documentado oferece às agências reguladoras evidências objetivas de que os métodos e os sistemas são adequados para uso desejado. Diversas são as técnicas usadas na validação de metodologias analíticas no setor farmacêutico. Em destaque podem ser citadas as técnicas cromatográficas, as quais envolvem a separação de possíveis interferentes e permitem a quantificação do analito de forma precisa, exata, sensível e rápida (HOTI et al., 2008; RUELA; ARAÚJO; PEREIRA, 2009; COLLIER et al., 2011).

A validação de metodologias analíticas para padronização de produtos farmacêuticos sintéticos e naturais tem seus parâmetros regidos pelas normas regulatórias constantes na Resolução RE 899/2003-ANVISA, bem como no copilado normativo do ICH (2012).

Visando estabelecer critérios analíticos para a garantia do controle de qualidade e a padronização de matérias-primas e medicamentos sejam eles de origem sintética, ou derivados vegetais, é importante o emprego de técnicas analíticas hífenadas, a exemplo da cromatografia gasosa acoplada ao detector por ionização em chama (CG-DIC) e a cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa (CG-EM), bem como outras técnicas isoladas, como a dissolução intrínseca e a análise térmica.

### **3.6. Análise Térmica**

O termo análise térmica é aplicado a qualquer técnica que envolva a medição de uma propriedade específica do material, enquanto a temperatura é controlada (alterada ou mantida) e monitorada. A definição correta segundo a Confederação Internacional de Análise Térmica e Calorimetria (ICTAC) é “estudo da relação entre uma propriedade da amostra e da sua temperatura quando a amostra é aquecida ou arrefecida de uma maneira controlada” (WENDLANDT, 1986; HAINES, 1995; MACHADO; MATOS, 2004; STORPIRTIS et al., 2009).

A implementação da análise térmica na indústria farmacêutica mostra-se como um outro método analítico, quantitativo e comparativo, capaz de produzir resultados rápidos e reprodutíveis, podendo ser utilizada no controle de qualidade (BRASIL, 2010).

Na Farmacopéia Brasileira 5ª edição (2010) a análise térmica foi incluída como técnica analítica que pode ser utilizada para avaliação do comportamento térmico, determinação do teor de umidade e/ou solventes, determinação da temperatura de ebulição e sublimação, determinação da temperatura de decomposição térmica e determinação do teor de cinzas através da análise termogravimétrica.

Dentre as técnicas termoanalíticas difundidas e utilizadas na área farmacêutica estão: Termogravimetria (TG), Análise Térmica Diferencial (DTA) e a Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC).

A TG é uma técnica termoanalítica na qual se analisa continuamente a massa da amostra, em uma atmosfera controlada, em função da temperatura ou do tempo (MACHADO; MATOS, 2004). O método termogravimétrico fornece informações sobre

reações de decomposição e oxidação, e de processos físicos como vaporização, sublimação e desorção. O estudo de decomposição térmica de sólidos compreende três etapas principais: isolamento e identificação dos intermediários e produtos finais da reação; determinação das constantes de velocidade; determinação dos parâmetros cinéticos, que caracterizam as reações de decomposição térmica (LIZARRAGA, ZABALETA, C.; PALOP, 2007; MACÊDO; NACIMENTO, 2002).

A DSC é uma técnica térmica em que a diferença na taxa de fluxo de calor entre a amostra e um material de referência é medida (WENDLANDT, 1986; STORPITIS et al., 2009). Os picos da calorimetria de varredura diferencial resultam tanto de modificações físicas como reações químicas induzidas por variações de temperatura da amostra. Os processos físicos endotérmicos incluem fusão, vaporização, absorção e desorção (CLAS; DALTON; HANCOCK, 1999).

As principais aplicações do DSC são: determinação do ponto de fusão; determinação do calor de fusão; determinação de pureza; caracterização de polimorfismo; caracterização de pseudopolimorfismo; estudo de diagramas de fase; evaporação, desorção e vaporização de substâncias; transição vítrea; estudo de compatibilidade droga-excipientes; estudo de estabilidade térmica; estudo de cinética de decomposição (FORD; TIMMINS, 1989; GIRON; GOLDBROM, 1997)

### **3.7. Cromatografia Gasosa e Cromatografia Líquida de Alta Eficiência**

A cromatografia é um método físico-químico de separação dos componentes de uma amostra, que são particionados entre duas fases, uma estacionária e outra móvel, tornou-se o primeiro método de separação de espécies químicas muito semelhantes, podendo ser empregada na identificação qualitativa e na determinação quantitativa das espécies separadas (DEGANI; CASS; VIEIRA, 1998; COLLINS; BRAGA; BONATO, 2006).

A Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) é uma técnica de separação que, em menos de trinta anos, passou a ser um dos métodos analíticos mais utilizados para fins qualitativos e quantitativos. As razões para este crescimento estão relacionadas à sua adaptabilidade para determinações quantitativas com boa sensibilidade, a possibilidade de separar espécies não voláteis e termicamente instáveis, com destaque para a indústria farmacêutica, bem como as suas aplicações em determinações

ambientais e em muitos outros campos da ciência, como o da medicina (MEYER, 2004).

A cromatografia gasosa (CG) é uma técnica para separação e análise de misturas de substâncias voláteis. A amostra é vaporizada e introduzida em um fluxo de um gás adequado denominado fase móvel (FM) ou gás de arraste. Este fluxo de gás com a amostra vaporizada passa por um tubo contendo a fase estacionária (FE) (coluna cromatográfica), onde ocorre a separação da mistura (AQUINO NETO, 2003).

As substâncias separadas saem da coluna dissolvida no gás de arraste e passam por um detector; dispositivo que gera o sinal elétrico proporcional à quantidade de material eluído. O registro deste sinal em função do tempo é o cromatograma, sendo que as substâncias aparecem nele como picos com área proporcional à sua massa, o que possibilita a análise quantitativa (COLLINS, 2006).

Um detector de ionização de chama (DIC) consiste em uma chama de hidrogênio ( $H_2$ ) ar e um prato coletor. O efluente passa da coluna do CG através da chama, a qual divide em moléculas orgânicas e produz íons. Os íons são recolhidos em um eletrodo negativo e produzem um sinal elétrico. O DIC é extremamente sensível com uma faixa dinâmica grande. Na análise dos óleos essenciais o DIC é o mais utilizado porque responde a todos os compostos orgânicos com alta sensibilidade e é muito estável, sendo sensível a mudanças de vazão, pressão e temperatura (AULTON, 2005).

A cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (CG-EM) é uma das técnicas mais utilizadas para identificar centenas de componentes em misturas orgânicas ou bioquímicas complexas (COLLINS, 2006). Esta técnica permite a separação dos constituintes pela cromatografia gasosa, que são introduzidos individualmente em ordem de eluição na câmara de ionização do espectrômetro de massas. O espectro de massas obtido para cada um dos constituintes geralmente indica a massa molecular e o seu padrão de fragmentação (AQUINO NETO, 2003).

O padrão de fragmentação pode ser comparado eletronicamente com aqueles constantes da biblioteca de espectros de massas. Desse modo, é possível resolver picos cromatográficos parcialmente superpostos. Assim, a espectrometria de massas acoplada à cromatografia gasosa fornece as fragmentações dos componentes individuais separados (TAVARES et al., 2005).

Metodologias desenvolvidas utilizando-se técnicas cromatográficas, como a CG e a CLAE, têm sido largamente utilizadas tanto para o estudo fitoquímico, quanto na

química analítica para o controle de qualidade de plantas medicinais, uma vez que proporciona vantagens como a alta eficiência e rapidez (RIBANI et al., 2004).

### 3.8. Cinética de Liberação

Os estudos *in vitro* constituem uma ferramenta muito valiosa e determinante na avaliação do comportamento de formulações de uso tópico, diante das inúmeras variáveis que influenciam o desempenho dos produtos e o processo de fabricação. Através deles, obtêm-se dados que possibilitam um maior entendimento dos fenômenos que ocorrem desde a aplicação na pele, liberação do fármaco da forma farmacêutica, retenção e absorção percutânea (STORPIRTIS et al., 2009).

O método *in vitro* mais utilizado para determinação da absorção percutânea é o sistema de difusão de Franz (SMITH, 1992). O sistema de células de difusão proposto por Franz em 1975, consiste em um compartimento doador e outro receptor, separados pela amostra de membrana (HADGRAFT, 2005; OECD, 2004). Assim, conforme o tipo de membrana utilizada pode-se dividir os testes *in vitro* em duas categorias: testes de liberação em membrana sintética e testes de permeação ou retenção utilizando membrana biológica, seja ela humana ou animal.

As membranas sintéticas são preconizadas pela *Food and Drug Administration* (FDA) para testes de liberação de formas farmacêuticas semi-sólidas *in vitro*. Esta membrana não é propriamente uma barreira para a difusão do fármaco, mas sim um suporte para o produto teste e se encontra em constante contato com o meio receptor (USP, 2012). Entre os tipos de membranas sintéticas, as membranas de acetato de celulose são as mais utilizadas (HADGRAFT et al., 2005).

O teste de liberação *in vitro*, sozinho, não deve ser aplicado na avaliação de formulações dermatológicas, pois o objetivo do teste não é necessariamente mimetizar o comportamento *in vivo* e sim avaliar indicadores de desempenho da formulação, ou seja, partição ou cedência do veículo para o fluido receptor (BEMVINDO, 2006).

### 3.9. Estudos de Citotoxicidade

A citotoxicidade tem sido definida como os efeitos adversos resultantes da interferência dos processos essenciais para a sobrevivência, proliferação e funções comuns a todas as células do organismo (EKWALL, 1999).

Os estudos de citotoxicidade *in vitro* representam um passo necessário para testar novos materiais para uso humano e fornecem informações a respeito da ação potencial tóxica de moléculas estudadas de forma mais rápida e com menos custo que os estudos *in vivo*. Neste tipo de ensaio, pode ser avaliada a morte, a viabilidade, os aspectos morfológicos, a integridade da membrana celular, o crescimento e a proliferação das células (CASTANO; LECHON, 2005).

Existem vários métodos utilizados para se testar a citotoxicidade nas pesquisas *in vitro*. Um dos mais utilizados é a avaliação da citotoxicidade basal por brometo de 3-(4,5-dimetil-tiazol-2-il)-2,5-difenil-tetrazólio (MTT). Para expressar a citotoxicidade basal, utiliza-se a CI50, ou seja, a concentração que afeta 50% das células comparando com as células não tratadas (controle) com a substância. Como regra geral, as células são expostas a diferentes concentrações das substâncias a serem estudadas por um determinado tempo do qual o grau de inibição das funções celulares basais é avaliado (CASTANO; LECHON, 2005).

O sal de tetrazólio ou MTT pode ser empregado como um método quantitativo colorimétrico para avaliação da sobrevivência e da proliferação de células. Esse método detecta o sinal gerado pela ativação de células vivas, cuja avaliação é realizada por um espectrofotômetro, leitor de ELISA, que apresenta um alto grau de precisão na leitura de incrementos celulares para o estudo de citotoxicidade. As vantagens do método colorimétrico são a sua rapidez e precisão (MOSMANN, 1983).

No estudo *in vitro* podem ser utilizados tipos celulares diferentes, as células 3T3 de fibroblastos de murinos Swiss albinos apresentam facilidade de obtenção, manutenção e manipulação, além de possuir a capacidade de se manter estável mesmo após muitas passagens, o que facilita o trabalho, fornecendo resultados mais confiáveis. Além disso, esta linhagem celular é largamente utilizada em outros ensaios de avaliação da citotoxicidade (CLOTHIER et al., 2006).

Diante das considerações expostas, observa-se que a disponibilização de alternativas terapêuticas a partir das plantas medicinais no âmbito das doenças negligenciadas é uma tendência de contribuição efetiva na saúde da população. A incorporação destes produtos em sistemas de liberação apropriados que protejam o princípio ativo e favoreçam a disponibilização destes no local de ação e não sejam tóxicos é de extrema importância. Por consequência, é de fundamental o estabelecimento de parâmetros de controle de qualidade de matérias-primas e

formulações farmacêuticas para a padronização e garantia da segurança e eficácia destes produtos.

## 4. DESENVOLVIMENTO: MATERIAL, MÉTODOS, RESULTADOS E DISCUSSÃO

---

### 4.1. Caracterização de derivado naftoquinônico (HBL)

#### 4.1.1. Caracterização de Derivados Naftoquinônicos com Atividade Leishmanicida através de Análise Térmica, Dissolução Intrínseca e Cromatografia Líquida

##### 4.1.1.1. Introdução

A leishmaniose é uma doença infecciosa causada por parasitas do gênero *Leishmania*, da família Trypanosomatidae. A doença é transmitida pela picada de flebotomíneos infectados com o protozoário (BLUM et al., 2012). A Organização Mundial da Saúde (OMS) declarou que a leishmaniose é uma das doenças mais negligenciadas, com 350 milhões de pessoas consideradas em risco de contrair a doença, cerca de 12 milhões de pessoas atualmente infectadas em 98 países e dois milhões de novos casos estima-se que ocorra anualmente (WHO, 2010; ALVAR, 2012; SAPORITO et al., 2013).

O tratamento clássico da leishmaniose requer a administração de medicamentos tóxicos e de baixa tolerância. O antimoniato de meglumina (Glucantime<sup>®</sup>) e o estibogluconato de sódio (Pentostam<sup>®</sup>) são os compostos de primeira linha utilizados no tratamento da leishmaniose. Outros medicamentos que podem ser utilizados incluem a pentamidina e anfotericina B (CROFT; BARRET; URBINA, 2005; NATERA et al., 2007). No entanto, a resistência do parasita reduz grandemente a eficácia dos medicamentos convencionais (CROFT; SUNDAR; FAIRLNAMB, 2006). Nos últimos quinze anos, a má aplicação clínica de drogas permitiu o desenvolvimento de resistência generalizada a estes agentes na Índia, onde a metade dos casos de leishmaniose visceral ocorre (HEPBURN, 2000). Além disso, não há vacinas eficazes para prevenir a doença (CARRIÓN; FOLGUEIRA; ALONSO, 2009; TIUMAN et al., 2011). Assim, drogas mais eficazes e seguras ainda são necessárias (COURA; CASTRO, 2002; PINTO; CASTO, 2009; GHAFARIFAR, 2010; SINGH; SUNDAR 2012).

Os esforços na busca de compostos bioativos naturais que possam ser utilizados no tratamento de doenças parasitárias não param (GHAFARIFAR, 2010). Algumas naftoquinonas naturais surgiram como promissoras na pesquisa da química medicinal devido as suas propriedades estruturais. Estes compostos podem gerar espécies reativas

de oxigênio (ROS), que levam ao estresse oxidativo e, posteriormente, ocasionam a morte do parasito (PINTO; CASTRO, 2009; SINGH; SUNDAR, 2012). Lima et al. (2004) descreveram a atividade leishmanicida do lapachol e alguns derivados, mostrando a utilidade potencial destas substâncias contra este parasita. Guimarães et al. (2013) estudaram a atividade leishmanicida de substâncias naftoquinônicas triazóis contra a forma promastigota da *L. infantum* e *L. amazonensis* resistente e sensível Sb(III).

A caracterização das propriedades do estado sólido utilizando metodologias analíticas apropriadas é um pré-requisito essencial para o desenvolvimento de formas farmacêuticas sólidas, considerando o âmbito científico e regulatório. Variações nas propriedades físico-químicas do ativo presente na formulação pode ter um impacto na terapêutica, na produção e nos níveis legais (GANDHI et al, 2002; TOMASSETTI et al., 2005; MOURA et al., 2010; NASCIMENTO et al., 2010; BOER et al., 2013).

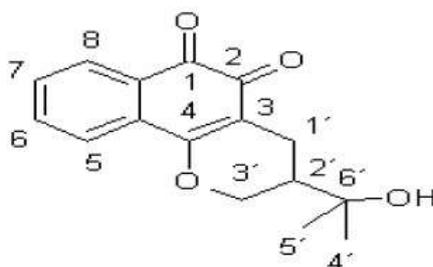
Variações na razão de aquecimento empregada nas técnicas térmicas DSC e TG ajudam a melhorar a resolução dos eventos térmicos (ROUQUEROL, 1964; PAULIK; PAULIK, 1971; SORENSEN, 1978; MAURIN; PANG; HUSSAIN, 1992; MAURIN; TAYLOR, 2000). Razões de aquecimento baixas favorecem a separação dos eventos que se sobrepõem, por outro lado, razões de aquecimento mais elevadas favorecem a detecção de eventos envolvendo pequena variação de calor específico, a exemplo da determinação da temperatura de transição vítrea (ARAÚJO et al, 2003).

O objetivo deste trabalho foi caracterizar derivado naftoquinônico obtidos a partir de uma mesma rota sintética, utilizando diferentes técnicas analíticas, incluindo análise térmica (TG e DSC), dissolução intrínseca e cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), para assegurar as propriedades físico-químicas do estado sólido, como indicativo de garantia de qualidade durante algumas etapas da metodologia de síntese.

#### **4.1.1.2. Material e Métodos**

##### **4.1.1.2.1. Amostras**

Foram avaliados seis lotes de bancada do derivado naftoquinônico HBL, nomeados como: HBL-1, HBL-2, HBL-3, HBL-4, HBL-5 e HBL-6. As amostras foram fornecidas pelo grupo que detém a patente da molécula. A estrutura química do HBL está demonstrada na Figura 1.

**Figura 1** – Estrutura química do HBL.

#### 4.1.1.2.2. Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC)

As curvas calorimétricas das amostras HBL foram registradas utilizando um calorímetro modelo DSC-50, da Shimadzu, calibrado com padrão índio, nas mesmas condições que as amostras. As curvas de DSC foram obtidas na razão de aquecimento de 2,0, 5,0, 10,0, 20,0, e 40,0°C/min, na faixa de temperatura ambiente até 400,0°C, em atmosfera de nitrogênio (50,0 mL/min). As amostras foram pesadas ( $2,0 \pm 0,2$  mg) e acondicionadas em um cadinho de alumínio, o qual foi hermeticamente fechado. A matéria-prima foi caracterizada através de suas fases de transição típicas utilizando o *software* Tasys<sup>®</sup> da Shimadzu.

#### 4.1.1.2.3. Calorimetria Exploratória Diferencial acoplada ao Sistema Fotovisual (DSC Fotovisual)

Os dados do DSC fotovisual foram obtidos usando um calorímetro, modelo DSC-50, da Shimadzu, acoplado a um sistema fotovisual modelo VCC-520, ligado a um microscópio Olympus e a uma câmara Sony, em atmosfera de nitrogênio (50,0 mL/min) na razão de aquecimento de 10,0°C/min na faixa de temperatura ambiente até 250,0°C. A quantidade de amostra utilizada foi de mg, acondicionada em cadinho de alumínio aberto. O sistema DSC fotovisual foi conectado a um computador utilizando o *software* Assimetrix. As imagens das amostras foram visualizadas e gravadas em tempo real de acordo com as suas curvas DSC observando-se a transição de fase.

#### 4.1.1.2.4. Análise Termogravimétrica (TG)

A análise termogravimétrica foi realizada utilizando uma termobalança modelo TGA-50H, da Shimadzu. As amostras foram pesadas ( $5,0 \pm 0,5$  mg), acondicionadas em

cadinho de alumina e analisadas nas seguintes razões de aquecimento: 10,0; 20,0 e 40,0°C/min na faixa de temperatura ambiente até 900,0°C, em atmosfera de nitrogênio (50,0 mL/min) e de ar sintético (20,0 mL/min). O aparelho foi calibrado utilizando mono-hidrato de oxalato de cálcio. Os dados foram analisados usando o *software* Tasys<sup>®</sup>, da Shimadzu.

#### 4.1.1.2.5. Estudo de Dissolução Intrínseca

As velocidades de dissolução intrínseca foram obtidas utilizando um sistema de disco rotativo, aparelho Wood da Vankel Industries, Inc. (Cary, NC), consistindo de um punção de aço, uma matriz e uma base de apoio. O material de teste foi colocado na cavidade da matriz com diâmetro de 0,5 cm. O pó é comprimido em uma prensa hidráulica utilizando a força de compressão mínima necessária para formar um disco compacto não desintegrante que terá apenas uma face, de área definida, exposta. A haste que fixa a matriz contendo o disco é conectada ao dissolutor e o disco é então imerso no meio de dissolução, quando a agitação se inicia.

O meio de dissolução estudados utilizado foi H<sub>2</sub>O. Os ensaios foram conduzidos utilizando uma velocidade de rotação de 100 rpm, volume do meio de 900 mL, quantidade de 100 mg da amostra e uma força de compressão de 1 tonelada por 1 min.

Para o ensaio realizou-se um perfil de dissolução, com 3 repetições, retirando-se alíquotas de 5 mL, nos tempos 5, 10, 15, 30 e 60 minutos. As alíquotas foram coletadas e filtradas em filtros de 10 µm. As concentrações analíticas das amostras eram recalculadas para cada alíquota tomada. Foram obtidas curvas de tempo *versus* concentração do padrão para as dissoluções.

As velocidade de dissolução intrínseca ( $j$ ), expressa em mg/min/cm<sup>2</sup>, foram determinadas utilizando a Equação 1, de acordo com Nascimento et al. (2010), onde V é o volume do meio de dissolução em mL,  $\Delta C$  é a variação da concentração em mg,  $\Delta t$  variação do tempo em minutos e A é a área superficial da amostra exposta ao meio de dissolução em cm<sup>2</sup>.

$$j = \left[ \left( \frac{V * \Delta C}{\Delta t} \right) * \left( \frac{1}{A} \right) \right] \text{----- Equação 1}$$

#### 4.1.1.2.6. Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)

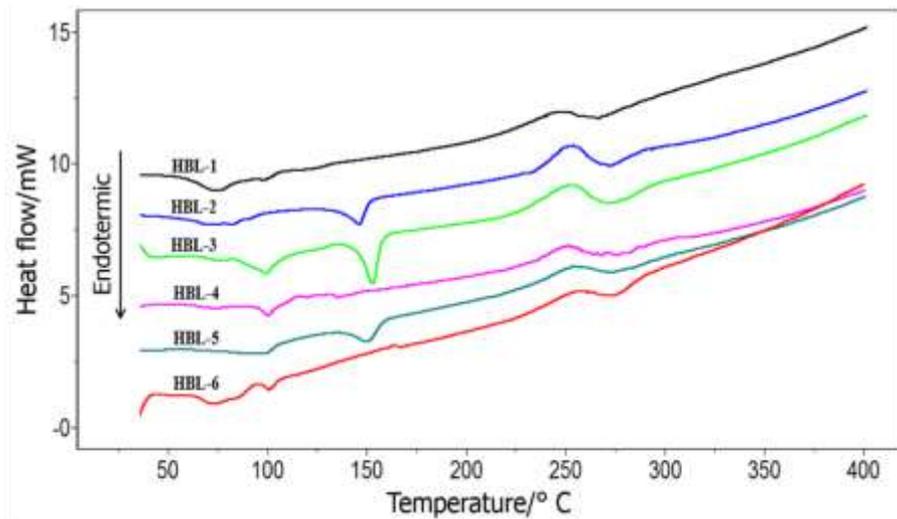
O HBL foi analisado por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) usando um sistema cromatográfico da Shimadzu (Série Proeminence) constituído de um sistema de bomba quaternário LC-20AT, sistema de injeção automática SIL-20A, degaseificador DGU-20A<sub>5</sub>, forno para coluna CTO-20A, detector de arranjo de diodos SPD-M20A e sistema de interface SCL-10A. A coluna utilizada foi a Shim-Pack CLC-C8 (250 mm x 4,6 mm, 5 µm), com um cartucho de pré-coluna Lunna C8 (4 mm x 3,0 mm, d.i.) da Phenomenex<sup>®</sup>, adquirido da Maxcrom Instrumentos Científicos Ltda (São Paulo, Brasil). A temperatura da coluna foi mantida em 40°C. A fase móvel utilizada foi constituída por uma mistura de metanol/água (48:52, v:v). O volume de injeção foi de 10 µL, o fluxo da fase móvel foi mantido constante a 1,2 mL min<sup>-1</sup> e a detecção de HBL foi efetuada no comprimento de onda de 255 nm. O *software* LC Solution<sup>®</sup> (Shimadzu) foi utilizado na aquisição e análise do dados.

#### 4.1.1.3. Resultados e Discussão

##### 4.1.1.3.1. Estudos Térmicos

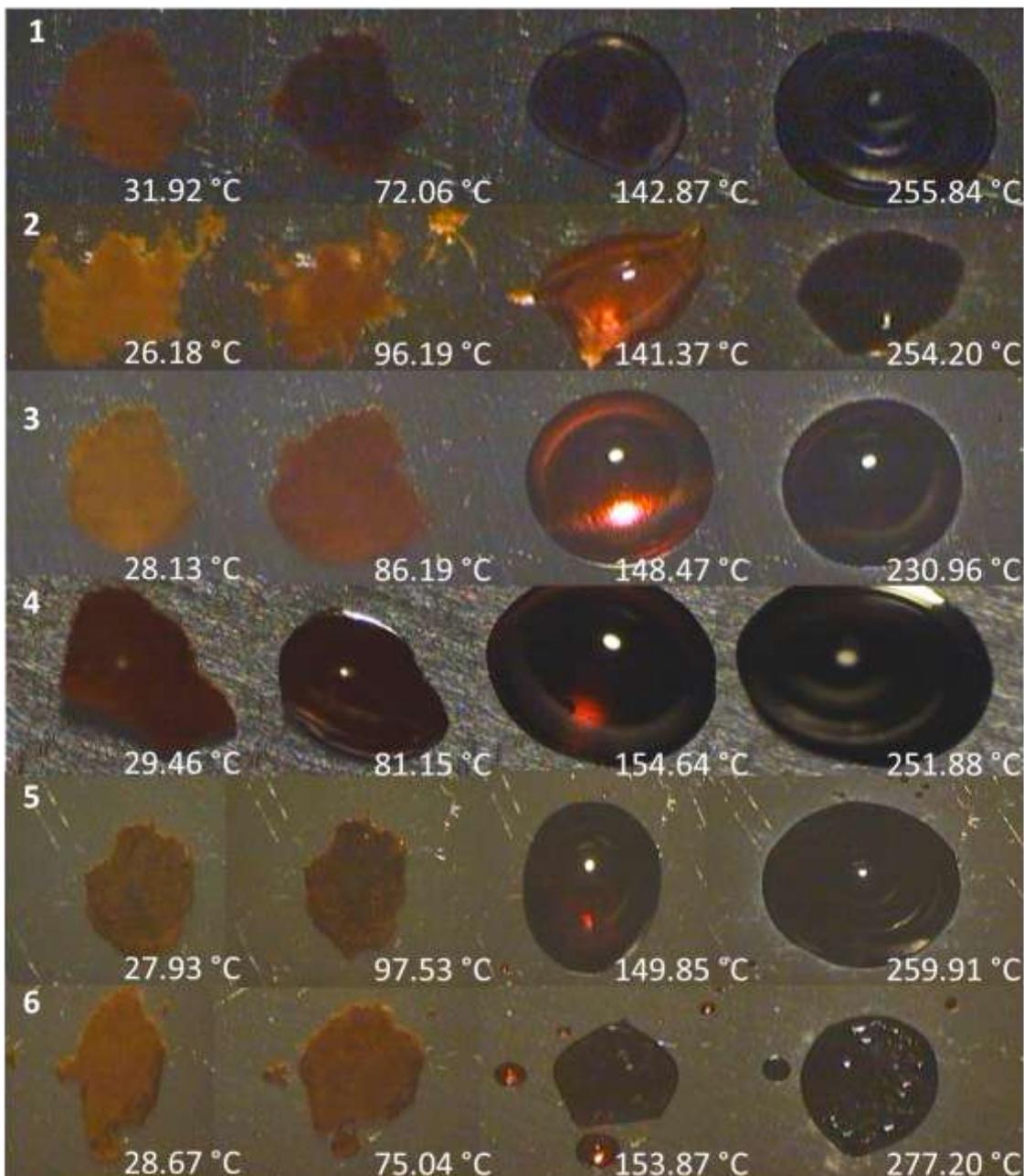
Derivados naftoquinônicos HBL foram melhor caracterizado na razão de aquecimento de 10°C/min. A análise da curva calorimétrica de HBL-1, HBL-2, HBL-3, HBL-4, HBL-5 e HBL-6 apresentaram diferentes comportamentos térmicos (Figura 2). As primeiras transições de fases ocorreram em temperaturas específicas para cada amostra, dentro do intervalo de 60-100°C, característica de substâncias voláteis, evaporação, incluindo a água. Três amostras mostraram picos endotérmicos característicos da fusão do HBL. Os valores da temperatura de fusão e entalpia das amostras de HBL-2, HBL-3 e HBL-5 foram 146,02°C e -26,22 Jg<sup>-1</sup>; 152,78°C e -46,60 Jg<sup>-1</sup>; e 149,85°C e -22,84 Jg<sup>-1</sup>, respectivamente. As transições de fase ocorreram no intervalo de 230-290°C, correspondente à decomposição do HBL. Os dados calorimétricos sugerem que as amostras possuem diferenças de grau de pureza, com base no fato de que a presença de pequenas quantidades de impurezas de uma amostra diminui o seu pico de fusão e amplia a sua faixa de fusão (ROUQUEROL, 1964).

**Figura 2** – Curvas calorimétricas de amostras do HBL na razão de aquecimento de 10°C/min.



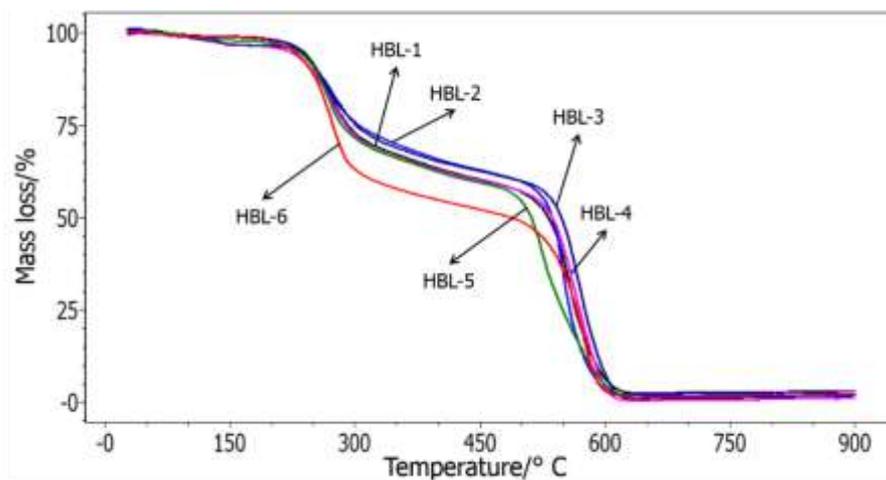
Curvas calorimétricas das amostras HBL-1, HBL-4 e HBL-6 não mostraram picos de fusão. O DSC-fotovisual (Figura 3) confirmou a baixa intensidade no processo de fusão de HBL-1 e HBL-6 e parcial processo de fusão em HBL-4. HBL-3 apresentou um processo de fusão definido, demonstrando que esta matéria-prima tem uma maior pureza. As amostras HBL-2 e HBL-5 apresentaram processos de fusão.

**Figura 3** – Imagens do DSC fotovisual das amostras de HBL. (1) HBL-1; (2) HBL-2; (3) HBL-3; (4) HBL-4; (5) HBL-5: e (6) HBL-6.



As curvas TG revelaram três etapas de perda de massa, a primeira é determinante para fins de análise, correspondendo a faixa de temperatura de decomposição das amostras observadas no DSC. As demais etapas correspondem à degradação da molécula até atingir as cinzas (Figura 4).

**Figura 4** – Curvas termogravimétricas do HBL na razão de aquecimento de 10°C/min.



Os dados de TG da primeira etapa de decomposição para as diferentes amostras foram obtidos, correspondendo respectivamente, ao intervalo de temperatura e a composição percentual: HBL-1: 229,17-303,47°C e 26,71%; HBL-2: 223,72-292,85°C e 19,39%; HBL-3: 228,07-303,38°C e 20,72%; HBL-4: 223,99-304,38°C e 23,41%; HBL-5: 232,97-286,74°C e 22,58%; e HBL-6: 215,76-294,78°C e 32,34%. As curvas TG mostraram diferenças de qualidade entre as seis amostras. HBL-2, HBL-3, HBL-4 e HBL-5 apresentaram perda de massa semelhante. HBL-1 foi intermediária e HBL-6 apresentou menor estabilidade térmica.

Os dados obtidos utilizando as técnicas térmicas foram coerentes considerando a sua qualidade física para os diferentes lotes de HBL. Foram encontrados 03 grupos de HBL através da interpretação dos dados térmicos. O primeiro grupo foi constituído do lote HBL-3, que apresentou melhor característica física, com estabilidade superior revelada pela maior temperatura de fusão e energia de ativação. O segundo grupo enquadra os lotes HBL-2 e HBL-5 com qualidade intermediária, evidenciadas pela temperatura de fusão e energia de ativação mais baixas. E o terceiro grupo, constituindo dos lotes HBL-1, HBL-4 e HBL-6, que apresentaram diferentes características térmicas e não foi evidenciado processo de fusão através da técnica DSC convencional. O DSC fotovisual confirmou estas diferenças entre os grupos, mostrou processos de fusão mais lentos e também que a coloração das amostras dos lotes HBL-1, HBL-4 e HBL-6 era mais escura. Correlacionando os dados, pode-se inferir que o processo do terceiro grupo de fusão é lento e tem baixo consumo de energia, tornando-se indetectável por DSC convencional.

#### 4.1.1.3.2. Dissolução Intrínseca

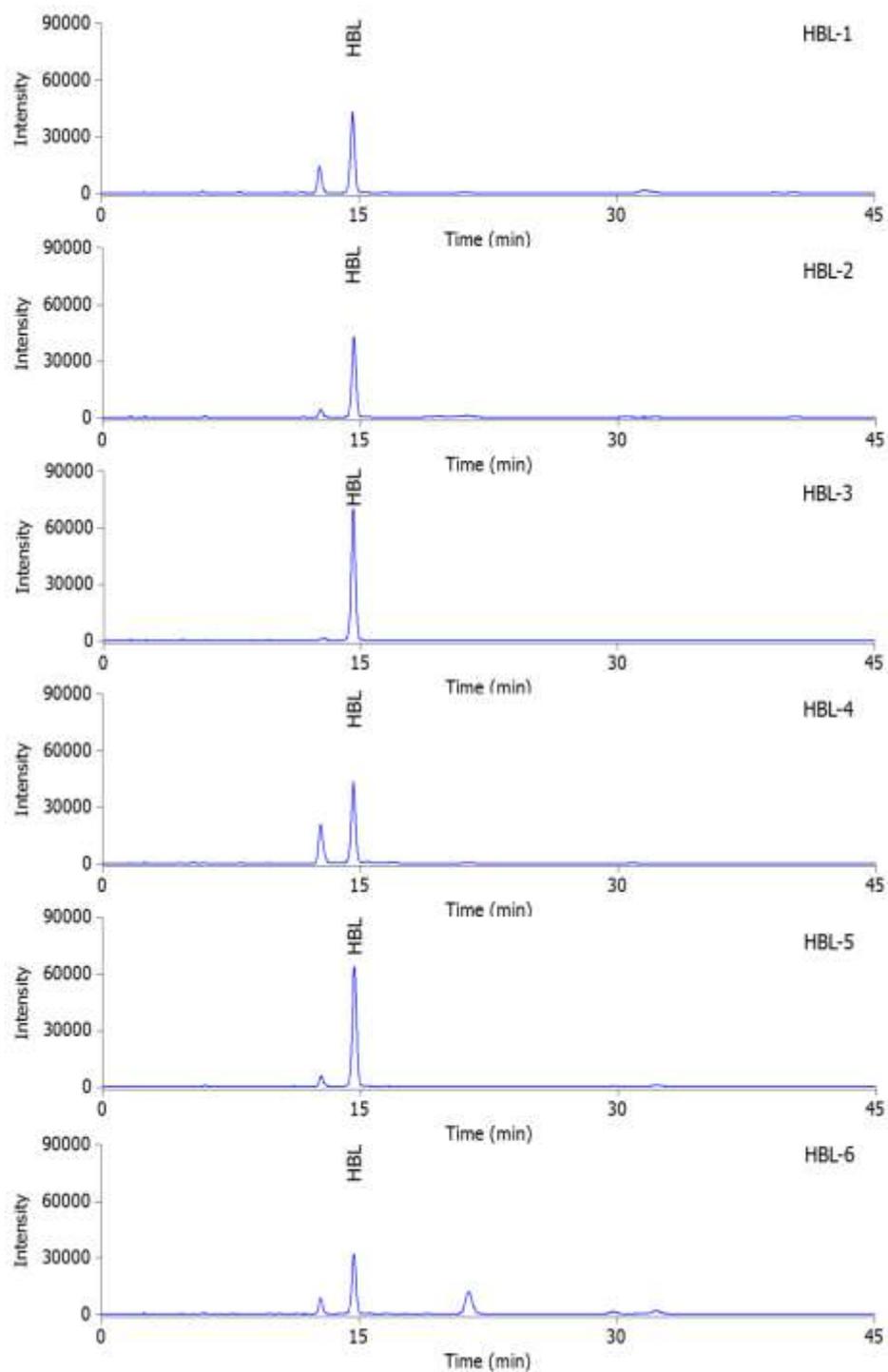
Os valores da dissolução intrínseca ( $j$ ) obtidos para as amostras HBL-1, HBL-2, HBL-3, HBL-4, HBL-5 e HBL-6 foram: 0,0132, 0,0252, 0,0079, 0,0174, 0,0165, e 0,0260 mg/min/cm<sup>2</sup>, respectivamente. Os dados mostraram diferentes valores entre as amostras. No entanto, todos eles foram caracterizados por terem baixa velocidade de dissolução, o que poderia alterar a eficácia terapêutica do fármaco, considerando que os valores de  $j < 0,1$  mg/min/cm<sup>2</sup>, sugerem que a dissolução é uma etapa limitante para a absorção (HEPBURN, 2000).

#### 4.1.1.3.3. Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)

A Figura 5 mostra os cromatogramas obtidos das amostras HBL-1, HBL-2, HBL-3, HBL-4, HBL-5 e HBL-6. Pode ser visto o pico principal correspondente ao derivado naftoquinônico e os demais as impurezas de cada amostra. Amostras com maior percentual de pureza em relação à área total dos picos, apresentou dados de ponto de fusão no DSC convencional. As diferenças entre os percentuais de área relativa e total dos picos, sugerem amostras com purezas distintas. Isto pode ser atribuído às reações incompletas do processo de síntese e/ou diferenças no processo de purificação (Tabela 1).

Uma comparação de dados térmicos com os dados de cromatografia confirmou a discriminação na qualidade física dos lotes de HBL produzidos em escala de bancada. O lote (3) apresentou um pico cromatográfico principal, enquanto que os lotes (2) e (5) mostraram a presença do pico principal e de um pico secundário quantificável, em um tempo de retenção menor. Os lotes (1), (4) e (6) mostraram claramente dois picos com intensidade elevada, sugerindo uma mistura com morfologia e solubilidade diferente do HBL. O lote (6) apresentou um novo pico intenso, evidenciando ser o lote de qualidade física menor.

**Figura 5** – Perfis cromatográficos do HBL-1, HBL-2, HBL-3, HBL-4, HBL-5 e HBL-6 em 280 nm.



**Tabela 1** – Percentual relativo, em relação a área total, dos picos correspondentes ao HBL-1, HBL-2, HBL-3, HBL-4, HBL-5 e HBL-6 e as impurezas em 280 nm.

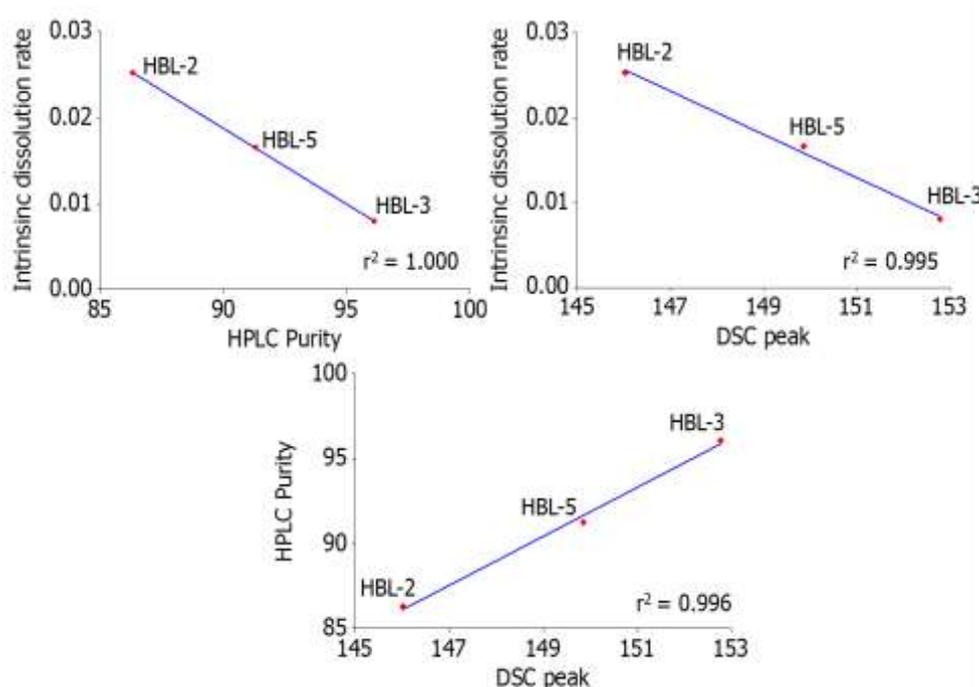
Amostra	Pico de impureza I			Pico do HBL			Pico de impureza II		
	Tempo	Área	%	Tempo	Área	%	Tempo	Área	%
<b>HBL-1</b>	12,7	380471	12,4	14,6	2442483	79,5	-	-	-
<b>HBL-2</b>	12,7	127156	4,5	14,6	2435170	86,3	-	-	-
<b>HBL-3</b>	12,8	89538	2,2	14,7	3981078	96,1	-	-	-
<b>HBL-4</b>	12,7	672065	20,1	14,6	2465081	73,6	-	-	-
<b>HBL-5</b>	12,7	178330	4,5	14,7	3635545	91,3	-	-	-
<b>HBL-6</b>	12,7	224150	6,6	14,7	1814556	53,0	21,3	1005144	29,4

A Figura 6 mostra diferentes correlações entre a velocidade de dissolução intrínseca, pureza cromatográfica e temperatura de fusão para HBL-2, HBL-3 e HBL-5. O HBL-2 apresentou maior velocidade de dissolução intrínseca ( $0,0252 \text{ mg/min/cm}^2$ ), menor percentual de pureza cromatográfica (86,3%) e temperatura de fusão ( $146,02^\circ\text{C}$ ). Enquanto o comportamento do HBL-3 foi de menor velocidade de dissolução intrínseca ( $0,0079 \text{ mg/min/cm}^2$ ) e maiores valores para os dois parâmetros, pureza cromatográfica (96,1%) e de temperatura de fusão ( $152,78^\circ\text{C}$ ). Dados obtidos do HBL-5 foram:  $0,0165 \text{ mg/min/cm}^2$  para dissolução intrínseca, 91,3% de pureza cromatográfica e  $149,85^\circ\text{C}$  para a temperatura de fusão.

A correlação entre a velocidade de dissolução intrínseca, pureza cromatográfica e temperatura de fusão foram inversamente linear para HBL-2, HBL-3, e HBL-5. A correlação entre a pureza cromatográfica em função da temperatura de fusão foi linear para HBL-2, HBL-3 e HBL-5.

As técnicas termoanalíticas de DSC e TG e a sua pureza cromatográfica determinaram o lote HBL-3 como o de melhor qualidade física.

**Figura 6** – Correlação dos dados das amostras HBL-2, HBL-3 e HBL-5.



#### 4.1.1.4. Conclusão

A análise térmica, a dissolução intrínseca e a cromatografia líquida de alta eficiência permitiram diferenciar a qualidade física do derivado naftoquinônico em diferentes lotes. O trabalho evidencia assim, a importância destas técnicas analíticas na avaliação da reprodutibilidade da tecnologia de síntese de matérias-primas presentes em diferentes produtos farmacêuticos.

#### Referências

- ALVAR J, I.D. VÉLEZ, C. BERN, M. HERRERO, P. DESJEUX, J. CANO, J. JANIN & M. DEN BOER (2012) *PLoS One* 7: 1-12.
- ARAÚJO A.A.S., S. STORPIRTIS, L.P. MERCURI, F.M.S. CARVALHO, M. SANTOS FILHO & J.R. MATOS (2003) *Int. J. Pharm.* 260: 303-314.

- BLUM J., D.N.J. LOCKWOOD, L. VISSER, G. HARMS, M.S. BAILEY, E. CAUMES, J. CLERINX, P.A.M. VAN THIEL, G. MORIZOT, C. HATZ & P. BUFFET (2012) *International Health* 4: 153-163.
- BOER T.M., J.V.V. PROCÓPIO, T.G. NASCIMENTO & R.O. MACÊDO (2013) *J. Pharm. Biomed. Anal.* 73: 18–23.
- CARRIÓN J., C. FOLGUEIRA & C. ALONSO (2009) *Procedia Vaccinol* 1:101–3.
- COURA J.R., S.L. CASTRO (2002) *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 97: 3
- CROFT S.L., M.P. BARRET & J.A. URBINA (2005) *Trends Parasitol* 21: 508–12.
- CROFT S.L., S. SUNDAR & A.H. FAIRLAMB (2006) *Clin. Microbiol. Rev.* 19:111–26.
- GANDHI R., O. PILLAI, R. THILAGAVATHI, B. GOPALAKRISHNAN, C.L. KAUL & R. PANCHAGNULA (2002) *Eur. J. Pharm. Sci.* 16:175–84.
- GHAFFARIFAR F. (2010) *Exp. Parasitol.* 126: 126.
- GUIMARÃES T.T., M.C.F.R. PINTO, J.S. LANZA, M.N. MELO, R.L. MONTENETO, I.M.M. MELO, E.B.T. DIOGO, V.F. FERREIRA, C.A. CAMARA, W.O. VALENÇA, R.N. OLIVEIRA, F. FRÉZARD & E.N. SILVA-JÚNIOR (2013) *Eur. J. Medicinal Chemistry* 63: 523-30.
- HEPBURN N.C. (2000) *Clin. Exp. Dermatol.* 25: 363–70.
- LIMA N.M.F., C.S. CORREIA, L.L. LEON, G.M.C. MACHADO, M.F. MADEIRA, A.E.G. SANTANA & M.O.F. GOULART (2004) *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 99: 757.
- MAURIN M.B. & A. TAYLOR (2000) *J. Pharm. Biomed. Anal.* 23: 1065-1071.
- MAURIN M.B., J.W.C. PANG & M.A. HUSSAIN (1992) *Thermochim. Acta* 209: 203–207.
- MOURA, E.A., L.P. CORREIA, M.F. PINTO, J.V.V. PROCÓPIO, F.S. SOUZA & R.O. MACÊDO (2010) *J. Thermal Anal. Calorim.* 100: 289-293.
- NASCIMENTO, T.G., I.D. BASÍLIO JÚNIOR, R.O. MACÊDO, E.A. MOURA, C.B. DORNELAS, V.B. BERNARDO, V.N. ROCHA & C. NÓVAK (2010) *J. Thermal Anal. Calorim.* 102: 269-275.
- NATERA S., C. MACHUCA, M.P. N-NIEVES, A. ROMERO, E. DÍAZ & A. PONTE-SUCRE (2007) *Int. J. Antimicrob Agents* 29: 637–42.
- OLIVEIRA, A.H., E.A. MOURA, M.F. PINTO, J.V.V. PROCÓPIO, V.G. SOUZA, F.S. SOUZA & R.O. MACÊDO (2011) *J. Thermal Anal. Calorim.* 106: 763-66.
- PAULIK J. & F. PAULIK (1971) *Anal. Chim. Acta* 56: 328–331.
- PINTO A.V. & S.L. CASTRO (2009) *Molecules* 14: 4570.

- ROUQUEROL J. (1964) *Mem. Soc. Chim.* 31: 31–32.
- SAPORITO L., G.M. GIAMMANCO, S. DE GRAZIA & C. COLOMBA (2013) *Int. J. of Infectious Diseases* 1617: 1–5
- SINGH B. & S. SUNDAR (2012) *Vaccine* 30: 3834.
- SORENSEN O.T. (1978) *J. Thermal Anal.* 13: 429–437.
- TIUMAN T.S., A.O. SANTOS, T. UEDA-NAKAMURA, B.P.D. FILHO & C.V. NAKAMURA (2011) *Int. J. Infectious Diseases* 15: 525–32.
- TOMASSETTI M, A. CATALANI, V. ROSSI & S. VECCHIO (2005) *J. Pharm. Biomed. Anal.* 37: 949–55.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION (2010) World Health Organ. Tech. Rep. Ser. technical 949: 1–186.

## **4.2. Desenvolvimento e Validação**

### **4.2.1. Desenvolvimento e validação de métodos de quantificação de citral e citronelal em óleos essenciais de *Cymbopogon citratus* e *Cymbopogon nardus* isolados e microemulsionados**

#### **4.2.1.1. Introdução**

Nos últimos tempos, tem-se renovado o interesse nas plantas medicinais devido ao imenso potencial farmacológico e o fato de que uma boa parte da população do mundo, particularmente nos países em desenvolvimento, utilizarem as plantas para o tratamento das doenças infecciosas e não infecciosas (HERNANDEZ et al., 2003; MELO et al., 2013).

Muitas substâncias derivadas de plantas são fontes atraentes para o desenvolvimento de novos agentes terapêuticos. Entre estes derivados naturais, os óleos essenciais têm sido relatados por apresentarem propriedades antimicrobiana, antifúngicas, antivirais e citotóxicos (REICHLING et al., 2009).

Os óleos essenciais são substâncias voláteis, que apresentam insolubilidade em água e complexidade química, o que dificulta a padronização de técnicas confiáveis, que possam ser reproduzidas e validadas, de modo a alcançar resultados seguros (NASCIMENTO et al., 2007, SCORZONI et al., 2007; CASTRO; LIMA, 2010; POZZATTI et al., 2010).

A garantia do uso seguro e eficaz de produtos obtidos a partir das plantas envolve análises físico-químicas e microbiológicas de matérias-primas e do produto acabado, como etapa preliminar para alcançar um padrão de qualidade necessário a um medicamento. Embora diversos estudos tenham demonstrado a necessidade de garantir segurança aos produtos de origem vegetal (BAUER; TITTEL, 1996; BRANDÃO et al., 2002; CHOI et al., 2002; BAST et al., 2002; MELO et al., 2004), a aplicação e a validação de métodos analíticos para matérias-primas a base de plantas ainda são escassos na literatura (WANG et al., 2003; RIBANI et al., 2004; ROLIM et al., 2005; LIMA et al., 2006; COSTA et al., 2011; COUTO et al., 2011; SOUSA et al., 2011; OLIVEIRA et al., 2012).

Para a avaliação da composição química dos óleos essenciais, tem-se que os avanços das técnicas analíticas instrumentais, aliadas a simplicidade, precisão e rapidez,

tornaram a cromatografia gasosa (CG) um dos processos mais difundidos para análises químicas, por ser uma técnica de separação eficiente para esclarecer uma determinada estrutura, tanto na indústria quanto nos laboratórios de pesquisa científica. Diversos pesquisadores destacam a cromatografia gasosa entre as melhores ferramentas analíticas e de extrema utilidade na análise de misturas complexas (FALSENJAK et al., 1987; KUSTRAK; PEPELINJARK, 1989; VELICKOVIC et al., 2002; RADULESCU et al., 2004; VÁGI et al., 2005; AVATO et al., 2005).

A validação de uma metodologia analítica é um processo que fornece uma evidência documentada de que o método é confiável ao que se aplica, consistindo em uma série de procedimentos que visam assegurar credibilidade às medidas obtidas. É considerada uma etapa muito importante e necessária para que o método desenvolvido possa ser utilizado, e os parâmetros linearidade, precisão, exatidão, recuperação, limite de detecção, limite de quantificação e robustez devem ser analisados (CASS & DEGANI, 2001).

Este trabalho teve o objetivo de desenvolver e validar métodos analíticos para quantificação dos monoterpênicos citral e citronelal em óleos essenciais de *Cymbopogon citratus* e *Cymbopogon nardus* isolados e incorporados em microemulsões.

#### **4.2.1.2. Material e Métodos**

##### **4.2.1.2.1. Material**

Os óleos essenciais de *C. citratus* e *C. nardus* foram obtidos da Phytoterápica (São Paulo, Brasil). Os marcadores citral e citronelal 95% foram obtidos da Sigma-Aldrich (UK).

As microemulsões obtidas pela incorporação dos óleos essenciais *C. citratus* (ME-citratus) e *C. nardus* (ME-nardus), cada uma com 5% de óleo incorporado, foram preparadas no Núcleo de Desenvolvimento Farmacêutico e Cosmético (NUDFAC) da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE).

Reagentes n-hexano Dinâmica<sup>®</sup> e Merck<sup>®</sup>, solução de ácido clorídrico (HCl) 1M, água destilada, solução hidróxido de sódio (NaOH) 0,1M e peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) 3 % também foram materiais utilizados.

##### **4.2.1.2.2. Preparo das Amostras**

#### 4.2.1.2.2.1. Marcador

O marcador citral, de teor declarado de 95% e densidade de 0,893 g/mL, foi preparado na concentração final de 357,2 µg/mL. O marcador citronelal, de teor declarado de 95% e densidade de 0,855 g/mL, foi preparado na concentração final de 171,0 µg/mL. Ambas soluções utilizaram n-hexano como solvente.

#### 4.2.1.2.2.2. Óleos Essenciais e Microemulsões

A amostra contendo o óleo essencial *C. citratus* isolado, de densidade 0,898 g/mL, foi preparada na concentração final de 359,2 µg/mL do marcador citral. E a amostra contendo o óleo essencial *C. nardus* isolado, de densidade de 0,891 g/mL foi preparada na concentração final de 178,2 µg/mL do marcador citronelal. Ambas utilizaram o n-hexano como solvente.

Para ME-citratus 5% uma alíquota de 400 µL foi adicionada a 5 mL de hexano, agitada em vortex por 3 minutos. Em seguida, 100 µL do sobrenadante foi adicionado a 1 mL de n-hexano, obtendo-se uma concentração final de 357,2 µg/mL do marcador citral.

Para ME-nardus 5% uma alíquota de 200 µL foi adicionada a 5 mL de hexano, agitada em vortex por 3 minutos. Em seguida, 100 µL do sobrenadante foi adicionado a 1 mL de n-hexano, obtendo-se uma concentração final de 171,0 µg/mL do marcador citronelal.

#### 4.2.1.2.3. Otimização dos Métodos Analíticos

O primeiro passo para o desenvolvimento do método analítico foi definir a sua finalidade (ROZET, 2013). Os métodos a serem desenvolvidos se propuseram a quantificação do teor do marcador citral no óleo essencial de *C. citratus* e na ME-citratus e do citronelal no óleo essencial de *C. nardus* e na ME-nardus, para o controle de qualidade e, por sua vez, dar suporte a atividade farmacológica destes derivados vegetais e seus produtos.

O estudo iniciou com a escolha do melhor solvente para o preparo da amostra, foram testados o n-hexano e acetato de etila. Verificou-se a solubilidade dos marcadores através da amplitude dos picos. As amostras dos marcadores e óleos essenciais foram preparadas por simples diluição no solvente extrator.

Para o preparo das amostras das microemulsões foi avaliado o tempo de agitação no vórtex, 1, 3 e 5 minutos.

O estudo prosseguiu com a determinação das condições operacionais. A Farmacopeia Brasileira (2010) descreve método geral para a quantificação de óleos essenciais. Na monografia do *Cymbopogon citratus* encontra-se método descrito por cromatografia gasosa com detector de ionização de chama (CG-DIC), no entanto o tempo de análise é extenso (80 minutos). Logo, buscou-se fontes da literatura que trabalhou com óleos essenciais e então foi seguido o desenvolvimento do método de quantificação do citral utilizando a metodologia analítica para quantificação do eugenol em óleos voláteis de *Cinnamomum zeylanicum* (TRAJANO, 2012), com algumas modificações pertinentes.

Para a quantificação do citronelal foi sendo ajustado a metodologia definida para o citral até a obtenção de cromatogramas com picos apresentando uma boa resolução.

#### **4.2.1.2.4. Validação do Método Analítico**

A validação foi realizada de acordo com as especificações definidas na Resolução 899/2003, da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), que traz o Guia para Validação de métodos analíticos e bioanalíticos (BRASIL, 2003), bem como pelas orientações da Conferência para Harmonização Internacional no Desenvolvimento e Validação de Métodos Analíticos (ICH, 2012). Os seguintes parâmetros foram avaliados: robustez, linearidade, seletividade/especificidade, limite inferior de detecção (LOD), limite inferior de quantificação (LOQ), precisão e exatidão.

##### **4.2.1.2.4.1. Robustez**

A robustez de um método analítico é a medida de sua capacidade em resistir a pequenas e deliberadas variações dos parâmetros analíticos. A determinação da robustez dos métodos foi avaliada através da variação de temperaturas do injetor e detector, do fabricante de n-hexano e de condições de armazenamento das amostras (Tabela 1).

**Tabela 1** – Parâmetros avaliados para a determinação da robustez do método para os óleos essenciais.

<i>Cymbopogon citratus</i>	<i>Cymbopogon nardus</i>
(-) Temperatura do injetor 265°C	(-) Temperatura do injetor 255°C
(+) Temperatura do injetor 275°C	(+) Temperatura do injetor 265°C
(-) Temperatura do detector 275°C	(-) Temperatura do detector 275°C
(+) Temperatura do detector 285°C	(+) Temperatura do detector 285°C
Hexano Merck®	Hexano Merck®
Presença de Luz (25°C)	Presença de Luz (25°C)
Ausência de Luz (25°C)	Ausência de Luz (25°C)
Sob refrigeração	Sob refrigeração

(-) Temperatura para valores abaixo da condição padrão.

(+) Temperatura para valores acima da condição padrão.

Para a avaliação da robustez para as microemulsões ME-citratus e ME-nardus foram avaliadas apenas as condições cromatográficas do equipamento.

Os resultados obtidos na condição dos métodos propostos foram comparados com os das condições alteradas e então aplicado o teste de ANOVA de fator único para ver se não apresentaram diferença estatisticamente significativa, com intervalo de confiança de 95%.

#### 4.2.1.2.4.2. Linearidade

A linearidade representa a capacidade de uma metodologia analítica de demonstrar que os resultados obtidos são diretamente proporcionais à concentração do analito na amostra, dentro de um intervalo especificado.

A linearidade dos métodos foi verificada a partir da análise de três curvas autênticas para cada marcador nas concentrações de 89,3; 178,6; 267,9; 357,2; 446,5; 535,8 e 714,4 µg/mL de citral e concentrações de 85,50; 128,35; 171,00; 213,75; 256,50 e 342,00 µg/mL de citronelal. Para cada curva foi preparada uma solução estoque. A partir de cada uma das soluções estoque foram preparadas diferentes concentrações por diluição.

Os resultados obtidos foram tratados estatisticamente através do cálculo de regressão linear pelo método dos mínimos quadrados. E para a avaliação do ajuste linear dos dados foram aplicados testes de normalidade para análise dos resíduos considerando intervalo de confiança de 95%.

#### 4.2.1.2.4.3. Especificidade/Seletividade

A especificidade/seletividade indica que o método não é afetado pela presença de impurezas, degradações ou excipientes. Em métodos cromatográficos, devem-se tomar as precauções necessárias para garantir a identidade dos picos cromatográficos.

O acoplamento de um cromatógrafo com o espectrômetro de massas combina as vantagens da cromatografia (alta seletividade e eficiência de separação) com as vantagens da espectrometria de massas (obtenção de informação estrutural, massa molar e aumento adicional da seletividade) (CHIARADIA, 2008). O CG-MS foi utilizado para a avaliação da seletividade dos métodos através do perfil da quebra de massa dos picos após degradação.

A especificidade/seletividade do método analítico foi avaliada através do estudo de degradação forçada dos óleos *C. citratus* e *C. nardus*, submetidos a degradação térmica, hidrólise ácida, alcalina, neutra e oxidativa (SINGH; BAKSHI, 2000). Os espectros de massas das amostras degradadas foram comparados com os espectros de massas de referência correspondentes as soluções do citral e citronelal que não foram submetidas ao estresse.

Estes parâmetros foram também avaliados pela comparação dos cromatogramas, nas condições pré-estabelecidas paralelamente a um branco da matriz contendo os excipientes e o solvente hexano, para demonstrar não existência de picos do branco da matriz sob o pico dos marcadores.

#### 4.2.1.2.4.4. Limite Inferior de Detecção e de Quantificação

O LOD é a menor concentração do analito que pode ser detectada, mas não necessariamente quantificada em uma amostra.

O LOQ é a menor concentração do analito que pode ser detectada com precisão e exatidão adequadas.

Por se tratar de um método cromatográfico, conforme Brasil (2003) e o ICH (2012), o limite inferior de detecção (LOD) e o de quantificação (LOQ) foram determinados utilizando as Equações 1 e 2, respectivamente.

$$LOD = \frac{3 \times EPADXY}{INCLINAÇÃO} \text{----- Equação 1}$$

$$LOQ = \frac{10 \times EPADXY}{INCLINAÇÃO} \text{----- Equação 2}$$

Onde, o EPADXY corresponde ao desvio padrão da regressão linear e a INCLINAÇÃO corresponde à inclinação (coeficiente angular) da reta média obtida na avaliação da linearidade do método.

#### **4.2.1.2.4.5. Precisão**

A precisão é a avaliação da proximidade dos resultados obtidos em uma série de medidas de uma amostragem múltipla de uma mesma amostra. Para sua verificação foram considerados dois níveis: a repetibilidade e a precisão intermediária.

Para avaliar a repetibilidade (precisão intra-corrída) foram efetuadas 6 (seis) determinações na concentração analítica correspondente a 100%. As amostras foram preparadas no mesmo dia, pelo mesmo analista e analisadas em um curto intervalo de tempo e nas mesmas condições analíticas.

Para avaliar a precisão intermediária (precisão inter-corrída) foram efetuadas, em 3 (três) diferentes dias, 6 (seis) determinações na concentração analítica correspondente a 100%. Para cada dia as amostras foram preparadas pelo mesmo analista, analisadas em um curto intervalo de tempo e nas mesmas condições analíticas.

Para a repetibilidade e precisão intermediária, o método foi considerado preciso se o coeficiente de variação para cada dia, separadamente, não foi maior que 5%. Foi aplicado o teste de ANOVA de fator único com intervalo de confiança de 95% para avaliar se o valor médio obtido entre os diferentes dias não foram estatisticamente diferentes.

#### **4.2.1.2.4.6. Exatidão**

O parâmetro exatidão, na validação analítica, tem por objetivo verificar a proximidade dos resultados médios obtidos em relação ao valor verdadeiro, ou seja, avalia a recuperação do analito frente aos interferentes da matriz da amostra.

A exatidão foi realizada através da análise de 9 (nove) determinações para três concentrações diferentes em torno da concentração analítica, contemplando a faixa de trabalho dos métodos. Foram utilizadas 3 (três) concentrações, baixa (80%), média (100%) e alta (120%), com 3 (três) replicatas para cada.

Para as amostras do óleo essencial, para obter as concentrações definidas foram diluídas a partir da solução estoque concentrações proporcionais a 80, 100 e 120% da concentração de trabalho de 359,2 µg/mL para o citral e de 178,2 µg/mL para o citronelal.

Para as amostras das microemulsões foram preparadas ME-citratus e ME-nardus nas concentrações de 4, 5 e 6%, proporcionais a 80, 100 e 120% da concentração de trabalho (359,2 µg/mL).

A exatidão foi expressa pela relação entre a concentração média determinada experimentalmente, frente ao padrão, e a concentração teórica correspondente, conforme Equação 3 abaixo.

$$Exatidão = \frac{\bar{C}_{ME}}{C_T} \times 100 \text{ ----- Equação 3}$$

Onde:  $\bar{C}_{ME}$  corresponde à concentração média experimental das replicatas e  $C_T$  a concentração teórica do respectivo nível.

O método foi considerado exato se o percentual de recuperação para a concentração baixa, média e alta, individualmente, estivesse entre 95 e 105%. Para avaliar se a recuperação entre os diferentes níveis não apresentou diferença estatisticamente significativa foi aplicado o teste de ANOVA de fator único com intervalo de confiança de 95%.

#### 4.2.1.3. Resultados e Discussão

O perfil cromatográfico em CG-EM, conforme já apresentado no Capítulo 3, permitiu evidenciar para as amostras de óleos essenciais de *Cymbopogon citratus* e *Cymbopogon nardus* estudadas, a identidade química e os principais constituintes como descritos na literatura.

Para o óleo *C. citratus* o constituinte majoritário foi o monoterpene citral correspondendo um percentual de 66,22% (BASSOLÉ et al., 2011; TEIXEIRA et al., 2013). E para o óleo *C. nardus* o constituinte majoritário foi o citronelal correspondendo a 37,89%. Assim, estes constituintes foram selecionados como marcadores para o controle de qualidade dos óleos e microemulsões.

##### 4.2.1.3.1. Otimização da Metodologia Analítica

Os solventes n-hexano e acetato de etila apresentaram amplitude do pico cromatográfico semelhante para ambos os marcadores. O n-hexano foi escolhido por ser o solvente de rotina nos estudos com cromatografia gasosa.

Os tempos de extração testados para ambos os marcadores nas microemulsões não apresentaram diferenças estatisticamente significativas, de acordo com os resultados obteve-se o F calculado = 0,1648 inferior ao F tabelado = 5,143 para o citral e o F calculado = 1,303 inferior ao F tabelado = 5,143 para o citronelal.

O melhor perfil cromatográfico é conseguido com uma boa resolução e um razoável tempo de execução. A temperatura inicial e a rampa de aquecimento são estatisticamente significativas para o tempo de retenção e a resolução do pico (HAROLD, 1997; HIEN et al., 2011). A metodologia para a quantificação do citral para o óleo e microemulsão foram baseadas no método proposto por Trajano (2012). Foram alteradas as condições cromatográficas referente ao tempo de isoterma, o fluxo da coluna e a temperatura do injetor, obtendo-se a resposta em um menor tempo de análise e com uma boa resolução.

A metodologia para a quantificação do citral não se aplicou para a quantificação do citronelal, o pico não apresentou boa resolução. Foram necessárias alterações nas condições cromatográficas, a exemplo da programação do forno, temperatura da coluna e injetor. As condições analíticas testadas estão descritas na Tabela 2.

**Tabela 2** – Variações das condições cromatográficas (CG-DIC) para a quantificação do marcador citronelal.

Condições Cromatográficas	Condição 1	Condição 2
		70°C
	5°C/min – 120	5°C/min – 120°C
	10°C/min – 190°C	10°C/min – 190°C
	20°C/min – 280°C	20°C/min – 280°C
	Fluxo 1,5	Fluxo 1,3
	T <sub>inj</sub> – 270 °C	T <sub>inj</sub> – 260 °C
Condições Cromatográficas	Condição 3	Condição 4
	60°C	70°C
	8°C/min – 120 – 3 min	10°C/min – 120 – 3 min
	10°C/min – 190°C	10°C/min – 190°C
	20°C/min – 280°C	20°C/min – 280°C
	Fluxo 1,3	Fluxo 1,3
	T <sub>inj</sub> – 260 °C	T <sub>inj</sub> – 260 °C

O pico do marcador citronelal foi melhor definido com a diminuição da temperatura do injetor e detector. No entanto, a completa resolução só foi obtida com a adição na programação do forno da isoterma de 3 min (Condição 3). A condição 4

diminuiu o tempo de saída do pico de 11 para 8 minutos. As condições cromatográficas foram então otimizadas e estão descritas na Tabela 3.

**Tabela 3** – Condições cromatográficas (CG-DIC) otimizadas para a quantificação dos marcadores citral e citronelal em óleos essenciais e microemulsões.

Parâmetro	Amostras	
	<i>C. citratus</i> ME-citratus 5%	<i>C. nardus</i> ME-nardus 5%
Equipamento	CG-DIC (Shimadzu)	CG-DIC (Shimadzu)
Programação do forno	70°C	60°C
	5°C/min – 105°C – 1 min.	10°C/min – 120°C – 3 min.
	10°C/min – 190°C	10°C/min – 190°C
	20°C/min – 280°C	20°C/min – 280°C
Volume de injeção	1 µL	1 µL
Temperatura do injetor	270°C	260°C
Razão do <i>split</i>	10	10
Temperatura do detector	280°C	280°C
Fluxo do gás de arraste (N <sub>2</sub> )	1,5 mL/min	1,3 mL/min
Coluna	DB-5	DB-5
	(30 m x 0,25 mm x 0,25 µm)	(30 m x 0,25 mm x 0,25 µm)
Tempo	21 min.	20 min.

#### 4.2.1.3.2. Validação dos Métodos Analíticos

##### 4.2.1.3.2.1. Robustez

O ensaio para a determinação da robustez foi realizado a partir da variação dos seguintes parâmetros: temperatura do injetor e detector, fabricante do n-hexano e condições de armazenamento da amostra (influência da luminosidade e temperatura). Os resultados estão apresentados na Tabela 4.

**Tabela 4** – Resultados da robustez com relação a variação da temperatura do injetor, detector, fabricante do solvente n-hexano e estabilidade dos óleos essenciais *C. citratus* e *C. nardus*.

Condições Analíticas	<i>C. citratus</i>		<i>C. nardus</i>	
	Concentração (%)	CV (%)	Concentração (%)	CV (%)
<b>Condição padrão</b>	99,01	1,44	99,66	1,06
<b>Temperatura injetor (-)</b>	99,13	0,96	99,72	0,64
<b>Temperatura injetor (+)</b>	99,57	1,02	98,52	1,59
<b>Temperatura detector (-)</b>	100,23	1,20	99,78	0,93
<b>Temperatura detector (+)</b>	98,83	1,58	98,41	1,29
<b>Hexano (Merck®)</b>	100,23	0,95	100,23	1,07
<b>Presença da luz (25°C)</b>	101,64	1,17	102,19	1,11
<b>Ausência da luz (25°C)</b>	100,35	1,10	99,02	1,21
<b>Sob refrigeração</b>	99,08	0,76	99,66	1,06

CV (Coeficiente de variação).

(-) Temperatura injetor e detector do *C. citratus* (245°C e 275°C) e do *C. nardus* (255°C e 275°C) para valores abaixo da condição padrão.

(+) Temperatura injetor e detector *C. citratus* (255°C e 285°C) e *C. nardus* (265°C e 285°C) para valores acima da condição padrão.

Para a análise de todas as variáveis do método para quantificação do citral e do citronelal no óleo *C. citratus* e *C. nardus*, obteve-se um  $F_{calculado}$  de 1,089 ( $F_{tabelado} = 2,392$ ) e 1,342 ( $F_{tabelado} = 2,657$ ), respectivamente, demonstrando que não houve diferenças estatisticamente significativas entre os mesmos.

Desta forma, com relação à estabilidade das amostras dos óleos essenciais *C. citratus* e *C. nardus* em solução de n-hexano, conclui-se que as mesmas foram estáveis quando armazenadas na ausência e presença da luz e sob refrigeração, por um período de 24 horas. O método também mostrou-se robusto em relação a variação dos fabricantes (Dinâmica® e Merck®) do n-hexano utilizado.

Na Tabela 5 observamos a avaliação do parâmetro robustez para as microemulsões ME-citratus e ME-nardus.

**Tabela 5** – Resultados da robustez com relação ao parâmetro variação de temperatura do injetor e detector para as microemulsões.

Condições Analíticas	ME-citratius		ME-nardus	
	Concentração (%)	CV (%)	Concentração (%)	CV (%)
<b>Condição padrão</b>	99,01	1,44	99,66	1,06
<b>Temperatura injetor (-)</b>	99,13	0,96	99,72	0,64
<b>Temperatura injetor (+)</b>	99,57	1,02	98,52	1,59
<b>Temperatura detector (-)</b>	100,23	1,20	99,78	0,93
<b>Temperatura detector (+)</b>	98,83	1,58	98,41	1,29

CV (Coeficiente de variação).

(-) Temperatura injetor e detector do *C. citratius* (245°C e 275°C) e do *C. nardus* (255°C e 275°C) para valores abaixo da condição padrão.

(+) Temperatura injetor e detector *C. citratius* (255°C e 285°C) e *C. nardus* (265°C e 285°C) para valores acima da condição padrão.

Para as microemulsões ME-citratius e ME-nardus os métodos propostos demonstraram ser robusto em relação às variações das condições de temperatura do injetor e detector. De acordo com os resultados obtidos para a ME-citratius, o  $F_{calculado}$  para a variação destes parâmetros foi de 2,333, inferior ao  $F_{tabelado}$  de 6,777. Para a ME-nardus, o  $F_{calculado}$  foi de 3,444, inferior ao  $F_{tabelado}$  6,777. Os valores obtidos não apresentaram diferenças estatisticamente significativas, com intervalo de confiança de 95%.

#### 4.2.1.3.2.2. Linearidade

A análise de regressão linear dos mínimos quadrados apresentou um coeficiente de correlação de 0,9986 para o marcador citral e de 0,9985 para o marcador citronelal, indicando linearidade dentro dos limites das concentrações estudadas, obtendo-se equações das retas  $y = 144,06x - 3034,9$  e  $y = 152,2x - 1699,1$  para o citral e citronelal, respectivamente.

Para avaliar a aplicabilidade do modelo de ajuste linear, os resíduos foram avaliados quanto à normalidade. Através da análise de variância pôde-se testar a validação do método e a significância estatística da curva ajustada (Tabelas 6 e 7). De acordo com os resultados, observou-se que o método é linear e não houve falta de ajustes para as médias estudadas.

Desse modo, os parâmetros da reta, obtidos através do ajuste linear dos dados, são adequados para explicar o aumento de sinal (área) do equipamento em função do aumento da concentração do analito nas soluções analisadas com intervalo de confiança de 95%.

**Tabela 6** – Resultado do tratamento estatístico obtido por ANOVA fator único para a regressão linear do método para determinação de teor do marcador citral no óleo essencial *C. citratus*.

<b>Fonte</b>	<b>GL</b>	<b>SQ</b>	<b>MQ</b>	<b>F</b>	<b>P</b>	<b>Ftabelado</b>
Modelo	1	17304072089	173040722089	16760,37	0,000	4,381
Residual	19	92244496	485500	Curva Linear		
Falta de ajuste	5	4523471	904694	1,690	0,066	2,958
Erro puro	14	4701025	335787	Não há falta de ajuste		
Total	20	17313296584				

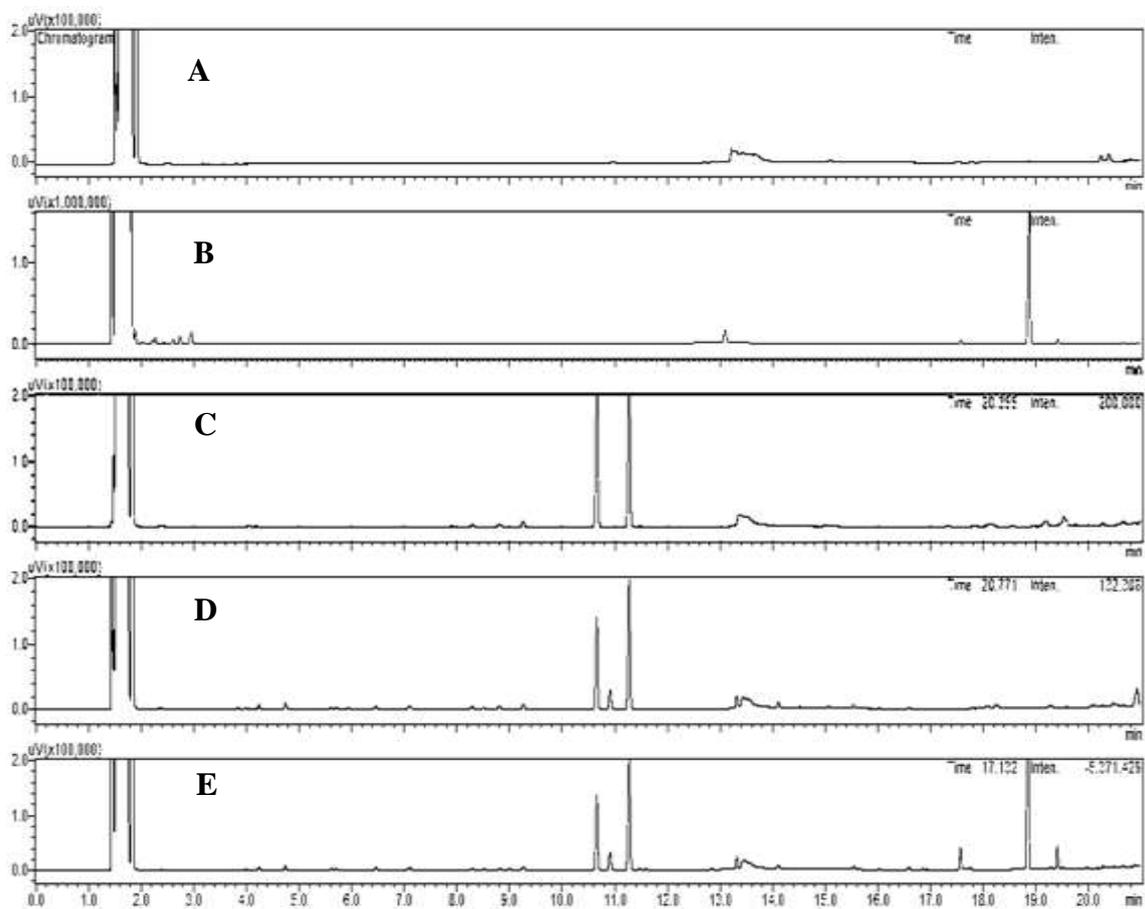
**Tabela 7** – Resultado do tratamento estatístico obtido por ANOVA fator único para a regressão linear do método para determinação de teor do marcador citronelal no óleo essencial *C. nardus*.

<b>Fonte</b>	<b>GL</b>	<b>SQ</b>	<b>MQ</b>	<b>F</b>	<b>P</b>	<b>Ftabelado</b>
Modelo	1	2991697288	2991697288	16760,37	0,000	4,494
Residual	16	2855973	178498	Curva Linear		
Falta de ajuste	4	1021739	255435	1,67	0,221	3,259
Erro puro	12	1834234	152853	Não há falta de ajuste		
Total	17	2994553260				

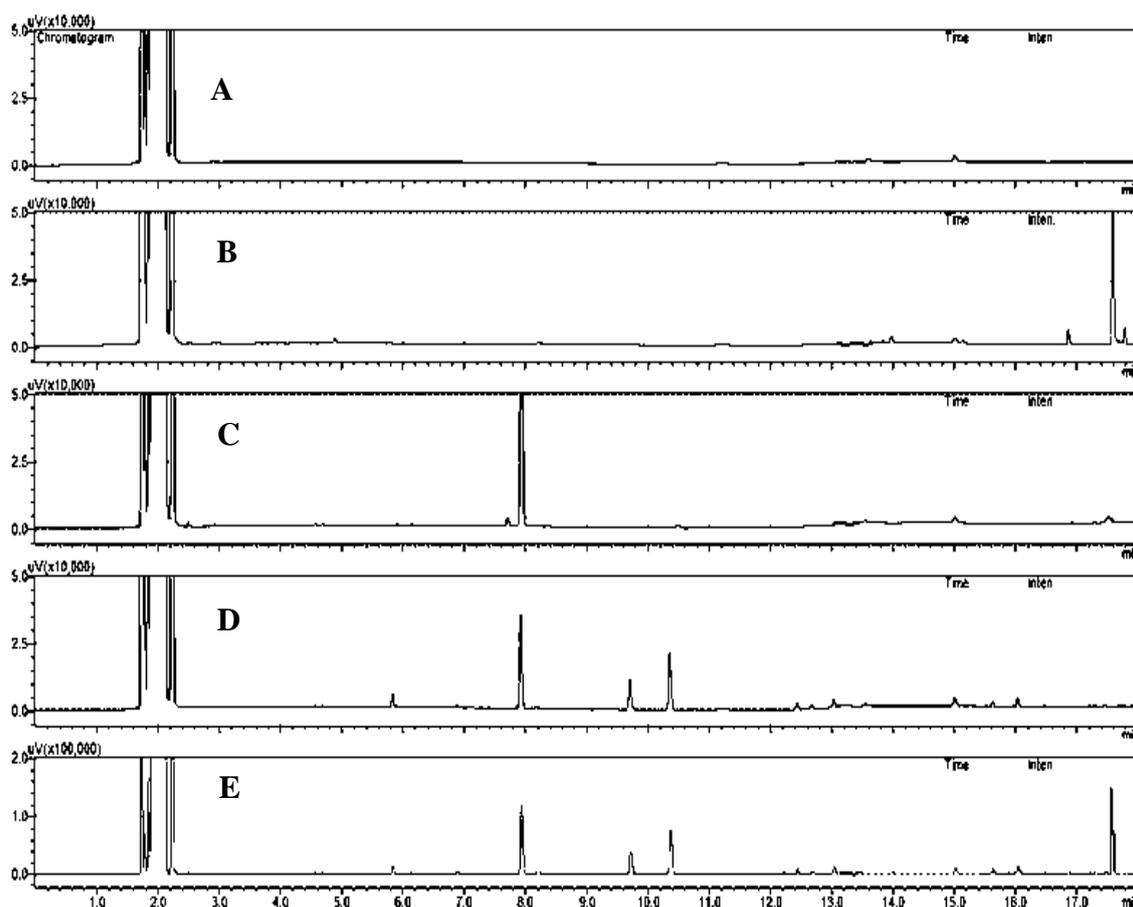
#### 4.2.1.3.2.3. Especificidade/Seletividade

Nas Figuras 1 e 2 estão apresentados os cromatogramas obtidos para análise da especificidade dos métodos. Através da análise visual das figuras podemos observar a ausência de picos interferentes no tempo de retenção correspondente ao citral e citronelal.

**Figura 1** – Especificidade do método determinada por CG-DIC. Cromatogramas da injeção do solvente hexano (**A**), branco da matriz (**B**), citral padrão (**C**), óleo essencial citral (**D**) e ME-citratus (**E**).

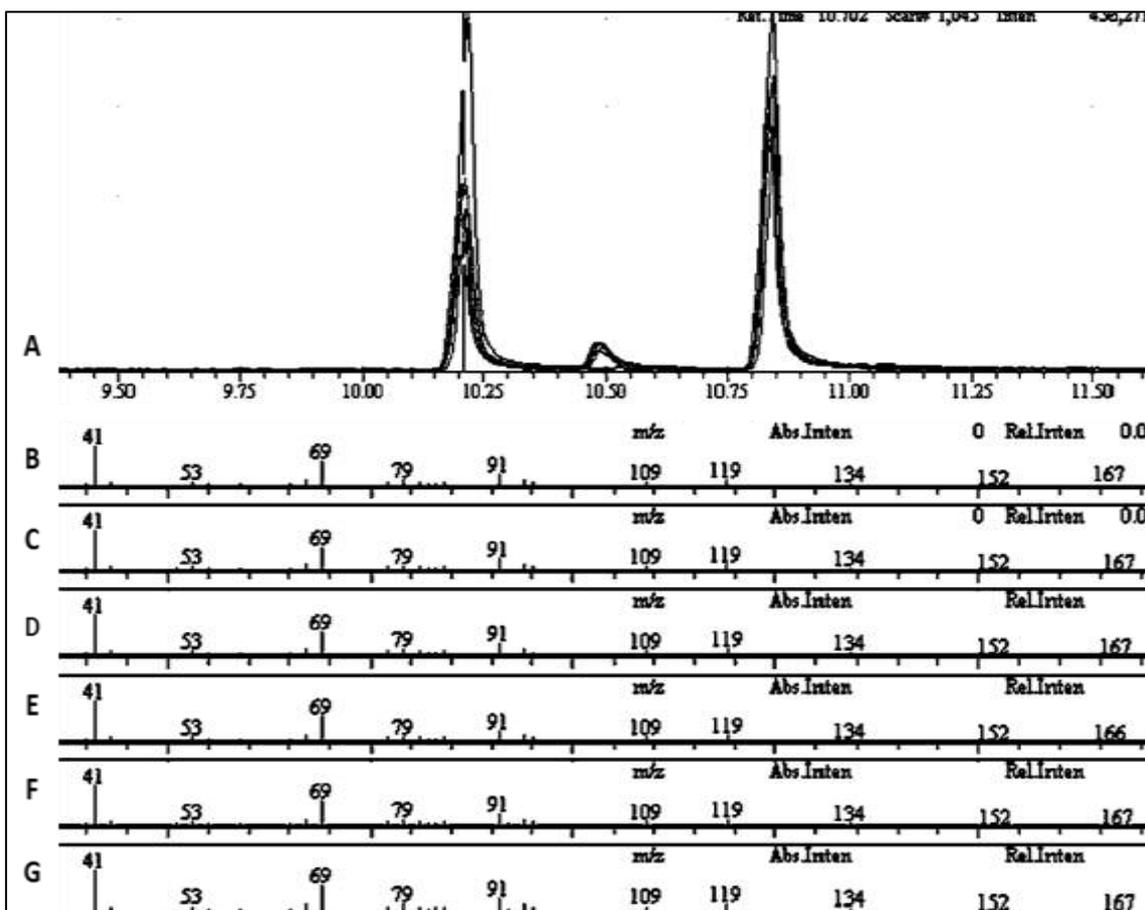


**Figura 2** – Especificidade do método determinada por CG-DIC. Cromatograma da injeção do solvente de solubilização (**A**), branco da matriz (**B**), citronelal padrão (**C**), óleo essencial citronelal (**D**) e ME-nardus (**E**).

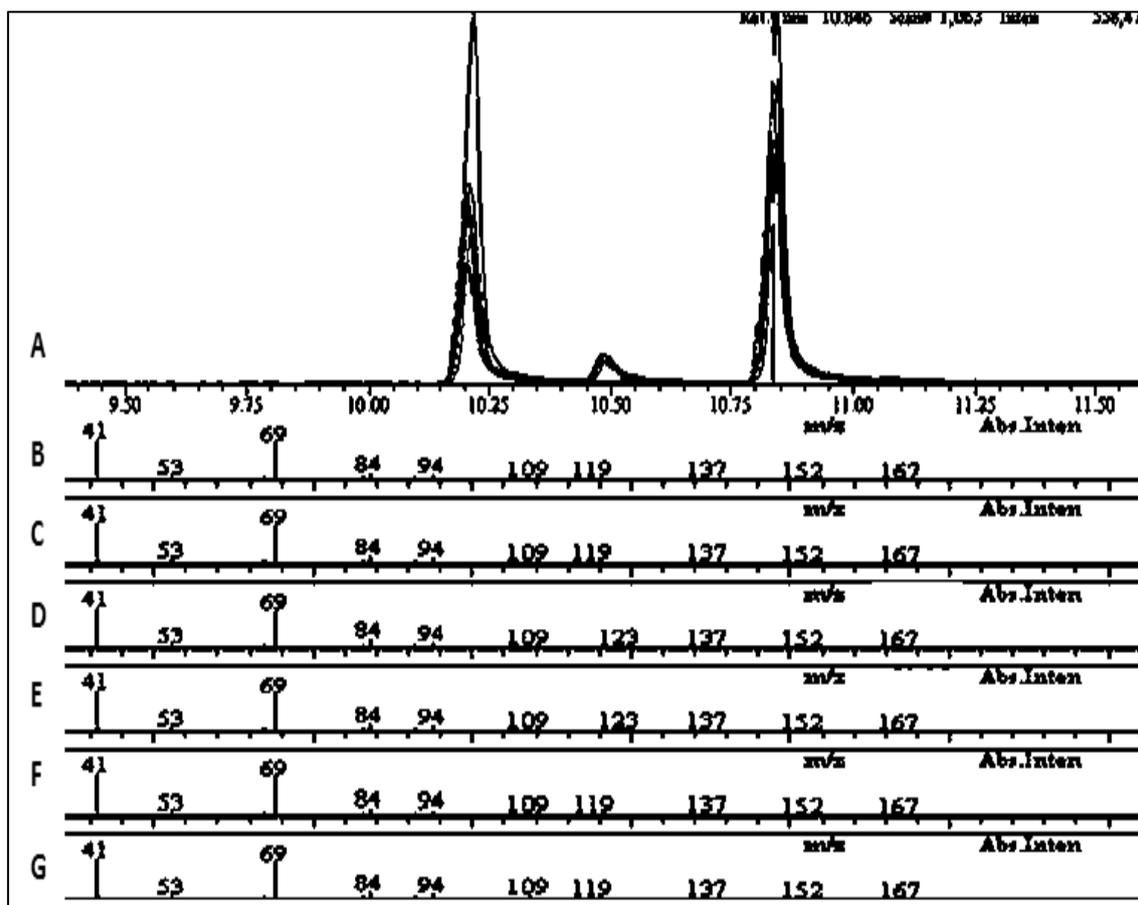


A seletividade do método foi comprovada no estudo de degradação forçada para os óleos essenciais. Os cromatogramas dos óleos essenciais *C. citratus* e *C. nardus* após a degradação forçada não apresentaram picos interferentes nos tempos de retenção do marcador citral e citronelal. A identidade do pico foi avaliada a partir das quebras de massa no CG-EM (Figuras 3, 4 e 5), sendo possível observar que as quebras correspondem aos picos do citral e citronelal, o que demonstra não haver coeluição de substâncias e, conseqüentemente, comprova a seletividade do método após degradação.

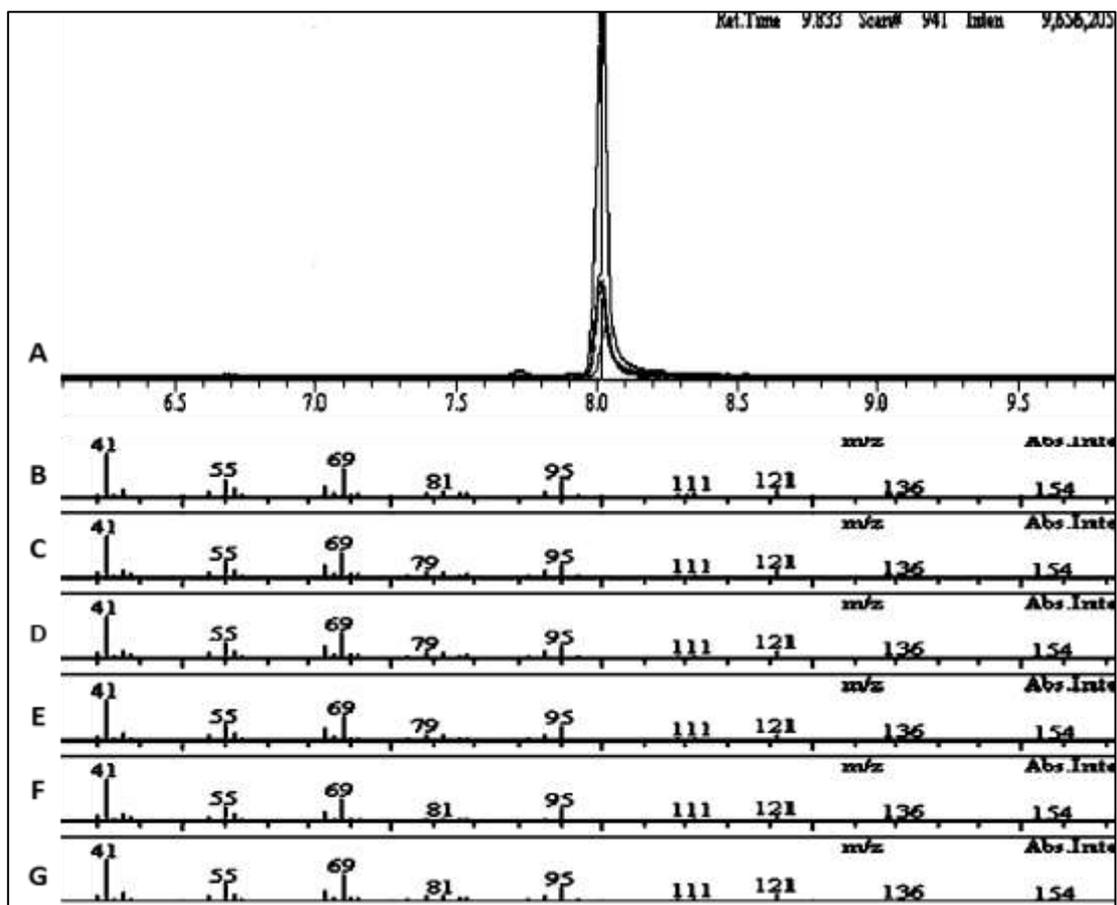
**Figura 3** – Seletividade do método determinada por CG-EM. Cromatogramas do marcador citral recém-preparado e das amostras de *C. citratus* após estresse (A), espectro da quebra de massa do marcador citral recém-preparada (B), espectros do citral nas amostras *C. citratus* após degradação térmica (C), hidrólise ácida (D), neutra (E), alcalina (F) e oxidativa (G). Espectros referentes à quebra de massa do geranial (citral  $\beta$ ).



**Figura 4** – Seletividade do método determinada por CG-EM. Cromatogramas do marcador citral recém-preparado e das amostras de *C. citratus* após estresse (A), espectro da quebra de massa do marcador citral recém-preparada (B), espectros do citral nas amostras *C. citratus* após degradação térmica (C), hidrólise ácida (D), neutra (E), alcalina (F) e oxidativa (G). Espectros referentes à quebra de massa do geranial (citral  $\alpha$ ).



**Figura 5** – Seletividade do método determinada por CG-EM. Cromatogramas do marcador citronelal recém-preparado e das amostras de *C. nardus* após estresse (A), espectro da quebra de massa do marcador citronelal recém-preparado (B), espectros do citronelal nas amostras *C. nardus* após degradação térmica (C), hidrólise ácida (D), neutra (E), alcalina (F) e oxidativa (G).



#### 4.2.1.3.2.4. Limite Inferior de Detecção e Quantificação

Conforme definido na Resolução 899/2003 da ANVISA (Brasil, 2003) e no ICH (2012), durante a validação de métodos analíticos cromatográficos, o limite de detecção (LOD) e o de quantificação (LOQ) pôde ser definido. Os valores obtidos para o LOD e o LOQ foram 8,29 e 27,63  $\mu\text{g/mL}$  para o citral e 7,99 e 26,62  $\mu\text{g/mL}$  para o citronelal.

#### 4.2.1.3.2.5. Precisão

Nas Tabelas 8 e 9 estão apresentados os resultados obtidos para a repetibilidade e a precisão intermediária dos métodos analíticos dos óleos essenciais e microemulsões.

**Tabela 8** – Repetibilidade e precisão intermediária do método analítico para determinação do teor do marcador citral em óleo essencial *C. citratus* e ME-citratus.

<b>Óleo essencial <i>C. citratus</i></b>						
<b>Dia</b>	<b>Repetibilidade<sup>1</sup></b>		<b>Precisão intermediária<sup>2</sup></b>		<b>Resultado Estatístico</b>	
	<b>Concentração (%)</b>	<b>CV (%)</b>	<b>Concentração (%)</b>	<b>CV (%)</b>	<b>Fcalculado</b>	<b>Ftabelado</b>
1	99,12	2,33				
2	98,52	1,93	99,99	1,34	0,481	3,682
3	101,33	0,95				
<b>ME-citratus</b>						
1	99,14	3,36				
2	98,63	1,39	98,97	3,92	1,883	3,682
3	97,93	2,06				

<sup>1</sup>Valores médios (n = 6 para cada dia).

<sup>2</sup>Valores médios (n = 18).

CV% (Coeficiente de variação).

**Tabela 9** – Repetibilidade e precisão intermediária do método analítico para determinação do teor do marcador citronela em óleo essencial *C. nardus* e ME-nardus.

<b>Óleo essencial <i>C. nardus</i></b>						
<b>Dia</b>	<b>Repetibilidade<sup>1</sup></b>		<b>Precisão intermediária<sup>2</sup></b>		<b>Resultado Estatístico</b>	
	<b>Concentração (%)</b>	<b>CV (%)</b>	<b>Concentração (%)</b>	<b>CV (%)</b>	<b>Fcalculado</b>	<b>Ftabelado</b>
1	98,64	1,79				
2	99,19	1,73	98,83	1,77	0,148	3,682
3	98,65	1,94				
<b>ME-nardus</b>						
1	99,73	3,02				
2	97,63	2,69	98,15	2,77	1,326	3,682
3	97,80	1,79				

<sup>1</sup>Valores médios (n = 6 para cada dia).

<sup>2</sup>Valores médios (n = 18).

CV% (Coeficiente de variação).

Os resultados demonstraram que os métodos apresentaram precisão adequada para a repetibilidade e para a precisão intermediária, pois o coeficiente de variação (CV) foi inferior a 5% para cada dia individualmente e para o conjunto de todos os dias. Além disso, foi verificado pelo teste de ANOVA de fator único, que não houve diferença estatisticamente significativa em função do  $F_{\text{calculado}} < F_{\text{tabelado}}$ , com intervalo de confiança de 95%, para os valores médios obtidos nos diferentes dias.

#### 4.2.1.3.2.6. Exatidão

Os resultados da exatidão dos métodos são mostrados nas Tabelas 10 e 11. Os resultados mostraram a adequabilidade dos métodos em relação à exatidão, pois os valores médios de recuperação para os três níveis foram entre (99,67 e 102,68%) e (96,66 e 102,24%) para o óleo essencial *C. citratus* e ME-citratus, respectivamente e entre (99,19 e 101,10%) e (97,11 e 102,30%) para o óleo *C. nardus* e ME-nardus, respectivamente, sendo admitidos, conforme especificações valores de 95,0 a 105,0% para este parâmetro.

**Tabela 10** – Exatidão em três diferentes níveis para teor de citral em óleo essencial *C. citratus* e ME-citratus.

<b>Óleo essencial <i>C. citratus</i></b>					
<b>Nível (%)</b>	<b>Concentração teórica (µg/mL)</b>	<b>Concentração experimental média (%)</b>	<b>CV (%)</b>	<b>Fcalculado</b>	<b>Ftabelado</b>
80	287,36	101,98	1,66		
100	369,20	99,67	1,11	1,546	5,143
120	431,04	102,68	2,29		
<b>ME-citratus</b>					
80	287,36	99,24	1,18		
100	359,20	101,79	1,74	4,838	5,143
120	431,04	96,66	2,71		

**Tabela 11** – Exatidão em três diferentes níveis para teor de citronelal em óleo essencial *C. nardus* e ME-nardus.

<b>Óleo essencial <i>C. nardus</i></b>					
<b>Nível (%)</b>	<b>Concentração teórica (µg/mL)</b>	<b>Concentração experimental média (%)</b>	<b>CV (%)</b>	<b>Fcalculado</b>	<b>Ftabelado</b>
80	142,60	100,79	1,15		
100	178,20	99,19	2,93	0,622	5,143
120	213,80	101,10	1,35		
<b>ME-nardus</b>					
80	142,60	102,30	2,88		
100	178,20	98,81	1,75	4,375	5,143
120	213,80	97,11	2,56		

A avaliação estatística pelo teste de ANOVA de fator único, confirma que não houve diferença estatisticamente significativa em função do  $F_{calculado} < F_{tabelado}$ , com intervalo de confiança de 95%, em relação aos valores médios de recuperação obtidos nos diferentes níveis, demonstrando assim que a recuperação dos marcadores para os dois métodos desenvolvidos a partir da matriz não é alterada nas condições avaliadas.

#### 4.2.1.4. Conclusão

Os métodos foram validados apresentando características de desempenho (robustez, linearidade, seletividade/especificidade, limite inferior de detecção, limite inferior de quantificação, precisão e exatidão) conforme os parâmetros preconizados na legislação vigente, o que comprova que os mesmos são adequados para utilização na rotina do controle de qualidade de microemulsões tópicas contendo os óleos essenciais *C. citratus* e *C. nardus*.

#### Referências

AVATO, P.; FORTUNATO, I. M.; RUTA, C.; D'ELIA, R. Glandular hair and essential oils in micropopagated plants of *Salvia officinalis* L. *Plant Science*, 2005.

BASSOLÉ I.H., LAMIEN-MEDA A., BAYALA B., OBAME L.C., ILBOUDO A.J., FRANZ C., NOVAK J., NEBIÉ R.C., DICKO M.H. Chemical composition and antimicrobial activity of *Cymbopogon citratus* and *Cymbopogon giganteus* essential oils alone and in combination. *Phytomedicine*. v.18(12) p.1070-4, 2011.

BAST, A., CHANDLER, R.F., CHOY, P.C., DELMULLE, L.M., GRUENWALD, J., HALKES, S.B.A., KELLER, K., KOEMAN, J.H., PETER, P., PRZYREMBEL, H., REE, E.M., RENWICK, A.G., VERMEER, I.T.M. Botanical health products, positioning and requirements for effective and safe use. *Environmental Toxicology Pharmacology* 12: 195-211, 2002.

BONFILIO, R.; CAZEDEY, E.C.L.; ARAÚJO, M.B.; SALGADO, H.R.N. Analytical validation of quantitative high-performance liquid chromatographic methods in pharmaceutical analysis: A practical approach. *Criticals Reviews in Analytical Chemistry*, v. 42, p. 87-100, 2012.

BRANDÃO, M.G.L., ALVES, R.M.S., MOREIRA, R.A., OLIVEIRA, P., VIEIRA, M.T., MOREIRA-CAMPOS, L.M. Qualidade de amostras comerciais de chás de plantas medicinais. *Revista Brasileira de Plantas Medicinais* 5: 56-59, 2002.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária-ANVISA. Resolução-RE nº 899, de 29 de maio de 2003. Determina a publicação do "Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos". Diário Oficial da União - D.O.U.; Poder Executivo, 02 de junho de 2003.

CASTRO RD, LIMA EO. Atividade antifúngica in vitro do óleo essencial de *Eucalyptus globulus* L. sobre *Candida* spp. *Revista de Odontologia UNESP*.;39(3):179-184, 2010.

CASTRO, H. G., PERINI, V. B. M., SANTOS, G. R., LEAL, T.C.A.B. Avaliação do teor e composição do óleo essencial de *Cymbopogon nardus* (L.) em diferentes épocas de colheita. *Revista Ciência Agronômica*, v. 41, n. 2, p. 308-314, abr-jun, 2010.

CHAN, C.C. Principles and practices of analytical method validation: validation of analytical methods is time-consuming but essential. *The Quality Assurance Journal*, v. 14, n. 3-4, p. 61-64, 2011.

CHIARADIA, M. C.; COLLINS, H. CAROL; JARDIM, I. C. F. O estado da arte da cromatografia associada à espectrometria de massas acoplada à espectrometria de massas na análise de compostos tóxicos em alimentos. *Química Nova*, v. 31, n. 3, p 623-636, 2008.

Choi DW, Kim JH, Cho SY, Him DH, Chang SY. Regulation and quality control of herbal drugs in Korea. *Toxicology* 181-182: 581-586, 2002.

COSTA, A.R.T. et al. Dissolution test of herbal medicines containing *Passiflora* sp. *Brazilian Journal of Pharmacognosy*, v.21, n.3, p.525-31, 2011.

COUTO, R.O. et al. Validated HPLC-PDA method for rosmarinic acid quantification in Rosemary. *Latin American Journal of Pharmacy*, v. 30, n.10, p.1951-6, 2011.

HERNÁNDEZ, F.; MADRID, J.; GARCIA, V.; ORENGO, J.; MEGIAS, M. D. Influence of two plant extracts on broilers performance, digestibility, and digestive organ size. *Poultry Science*, v. 83, p. 169-174, 2004.

ICH GUIDELINE. International conference on harmonisation of technical requirements for registration of pharmaceuticals for human use. *Validation of analytical procedures: text and methodology Q2(R1)*. Disponível em: <http://www.ich.org/products/guidelines/quality/article/quality-guidelines.html>. Acessado em: 10 de setembro de 2013.

LIMA, L.R. et al. Desenvolvimento e validação da metodologia de quantificação gravimétrica de resina glicosídica em fitoterápicos contendo *Operculina macrocarpa* (L.) Urban. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, v.16, n.4, p. 562-7, 2006.

MELO, J.G.; NASCIMENTO, V.T.; AMORIM, E.L.C.; LIMA, C.S.A. & ALBUQUERQUE, U.P. Avaliação da qualidade de amostras comerciais de boldo (*Peumus boldus* Molina), pata-de-vaca (*Bauhinia* spp.) e ginko (*Ginkgo biloba* L.) *Revista Brasileira de Farmacognosia* 14(2): 111-120, 2004.

NASCIMENTO, E. A.; PINHEIRO, A. L. Análise dos constituintes químicos e da atividade antimicrobiana do óleo essencial de *Melaleuca alternifolia* chell. *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais*, Botucatu, v. 6, n. 1, pp. 63-70, 2007.

OLIVEIRA, P.C. et al. Obtaining a dry extract of *Pterodon emarginatus* (Fabaceae) fruits by spray-drying. *Journal of Pharmacy Research*, v. 5, n.1, p.641-5, 2012.

POZZATTI, P. et al. Comparison of the susceptibilities of clinical isolates of *Candida albicans* and *Candida dubliniensis* to essential oils. *Mycoses*, v.53, p.12-15, 2010.

RADULESCU, V.; CHILIMENT, S.; OPREA, E. Capillary gas chromatography–mass spectrometry of volatile and semi-volatile compounds of *Salvia officinalis*. *Journal of Chromatography A*, 1027, p.121, 2004.

Reichling, J., Schnitzler, P., Suschke, U., Saller, R., 2009. Essential oils of aromatic plants with antibacterial, antifungal, antiviral, and cytotoxic properties—an overview. *Forsch Komplementmed*. 16, 79–90.

ROLIM, A. et al. Validation assay for total flavonoids, as rutin equivalents, from *Trichilia catigua* A. Juss (Meliaceae) and *Ptychopetalum olacoides* Bentham (Olacaceae) commercial extract. *Journal of AOAC International*, v.88, n.4, p.1015-9, 2005.

SANTOS, V. L.; SOUZA, M. F. V.; BATISTA, L. M.; SILVA, B. A.; LIMA, M.S.; SOUZA, A. M. F.; BARBOSA, F. C.; CATÃO, R. M. R. Avaliação da atividade antimicrobiana de *Maytenus rigida* Mart. (Celastraceae). *Revista Brasileira de Plantas*

*Medicinais, Botucatu*, v.13, n.1, p.68-72, 2011.

SCORZONI L, BENADUCCI T, ALMEIDA AMF, SILVA DHS, BOLZANI VS, MENDES-GIANNINI MJS. Comparative study of disk diffusion and microdilution methods for evaluation of antifungal activity of natural compounds against medical yeasts *Candida* spp and *Cryptococcus* sp. *Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada.*;28(1):25-34, 2007.

SINGH S, BAKSHI M. Guidance on conduct of stress tests to determine inherent stability of drugs. *Pharmaceutical Technology*. 24:1-14, 2000.

SOUSA, S.A. et al. Dissolution test of herbal medicines containing *Paullinia cupana*: validation of methods for quantification and assessment of dissolution. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*, v.47, n. 2, p.269-77, 2011.

TRAJANO, V. N. *Ação Antifúngica de microcápsula contendo óleo essencial de Cinnamomum zeylanicum sobre Aspergillus Flavus*. 108f. Tese (doutorado em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos). Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2012.

VÁGI, E.; SIMÁNDI, B.; SUHAJDA, A.; HÉTHELVI, É. Essential oil composition and antimicrobial activity of *Origanum majorana* L., extracts obtained with ethyl alcohol and supercritical carbon dioxide. *Food Research International*, 38, p. 51-57, 2005.

### 4.3. Caracterização de Microemulsões

#### 4.3.1. Caracterização Físico-Química de Microemulsões de Óleos Essenciais *Cymbopogon citratus* e *Cymbopogon nardus*

##### 4.3.1.1. Introdução

As microemulsões são sistemas homogêneos, termodinamicamente estáveis, apresentam dimensões variando entre a escala micrométrica e nanométrica, transparência óptica, capacidade de veicular fármacos hidrofílicos e lipofílicos, além de serem formadas espontaneamente pela mistura de seus componentes (YUAN et al., 2006; DIXIT; NAGARSENKER, 2010; JAIN, FERNANDES; PATRAVALE, 2010), sendo consideradas sistemas líquidos ideais para a liberação de fármacos (MAGHRABY, 2008).

No desenvolvimento de produtos de uso tópico, uma das principais vantagens das microemulsões em comparação aos sistemas convencionais está relacionada ao seu reduzido diâmetro de gotícula, o que permite a aplicação de um depósito uniforme na pele resultando em uma elevada superfície de contato do sistema com este órgão. Estas formulações também podem promover a penetração de substâncias de interesse por meio da fluidização natural da pele, uma vez que os óleos e tensoativos presentes na formulação podem fazer com que as camadas da pele se desestremam, favorecendo a penetração (BOUCHEMAL *et al.*, 2004; SONNEVILLE-AUBRUN; SIMONNET; L'ALLORET, 2004).

A avaliação dos parâmetros físico-químicos é de fundamental importância na investigação de microemulsões com potencial sistema de entrega (DOMINGO & SAURINA 2012). Além de confirmar a formação dos sistemas, pode ser utilizada como parâmetros para modificar seu comportamento para uma finalidade específica (DAMASCENO et al., 2011; ROSSI et al., 2007).

Diversas técnicas podem ser utilizadas para a caracterização das microemulsões (DAMASCENO, 2011). Métodos mais tradicionais podem ser utilizados para avaliar os aspectos macroscópicos como: pH, viscosidade, índice de refração, condutividade elétrica ( $\sigma$ ) e potencial zeta, que são importantes para determinar o tipo de microemulsão e caracterizá-la fisicamente (CONSTANTINIDES et al., 1995).

Um dos métodos mais utilizado para a caracterização de ME é o espalhamento dinâmico de luz (DLS – Dynamic Light Scattering). Trata-se de uma técnica não invasiva para a medição do tamanho das partículas, com tamanho menor que 1 µm. Quando essas gotículas são iluminadas por um feixe de luz laser, ocorre o espalhamento deste, que, sendo detectado em um ângulo determinado, varia em uma taxa dependente da velocidade de difusão da partícula, a qual, por sua vez, é governada pelo seu tamanho (ROSSETI, 2006), fornecendo informações diretas sobre o movimento translacional das gotículas e permitindo o cálculo do tamanho destas através de relações empíricas adequadas (FORMARIZ, 2006).

A utilização dos ensaios *in vitro* de estudo da liberação de fármacos, como perspectiva de caracterização das formulações, tem assumido importância crescente. Atualmente, este tipo de ensaios, constitui uma das metodologias de suporte ao desenvolvimento de novas formulações, ao controle de produção e do produto acabado (FARINHA et al., 2001). A determinação do modelo de cinética de liberação que as substâncias ativas obedecem na formulação desenvolvida, permite a obtenção de informações sobre a dependência do processo de liberação destes fármacos em função das características da formulação (COSTA; LOBO, 2001).

Neste trabalho, foram caracterizados os sistemas microemulsionados para administração tópica, obtidos pela incorporação dos óleos de *Cymbopogon citratus* e *Cymbopogon nardus*, através dos parâmetros de pH, condutividade, tamanho de partícula, índice de polidispersão, potencial zeta e cinética de liberação.

#### **4.3.1.2. Material e Métodos**

##### **4.3.1.2.1. Materiais**

Os óleos essenciais de *C. citratus* e *C. nardus* foram obtidos da Phytoterápica (São Paulo, Brasil). Os marcadores citral e citronelal foram obtidos da Sigma-Aldrich (UK). Os excipientes usados foram: miristato de isopropila (Henrifarma), polietilenoglicol-8 cáprico caprílico glicérido (Labrasol<sup>®</sup>, Gattefossé), poligliceril 6-dioleato (Plurol Oléico<sup>®</sup>, Gattefossé), água purificada do sistema Millipore Milli-Q<sup>®</sup> (Millipore Corporation, USA).

As formulações obtidas pela incorporação dos óleos essenciais *C. citratus* (ME-citratus) e *C. nardus* (ME-nardus), cada uma com 5% de óleo incorporado, foram preparadas no Núcleo de Desenvolvimento Farmacêutico e Cosmético (NUDFAC) da

Universidade Federal da Paraíba (UFPB) e gentilmente cedidas pela Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Leila Leal.

Outros materiais utilizados foram: etanol absoluto PA (Merck), hexano PA (Merck), membranas sintéticas (Anow<sup>®</sup> Microfiltration) de fluoreto de polivinilideno (PVDF), politetrafluoretileno (PTFE) e nitrocelulose (NC), todas com poro de 0,45  $\mu\text{m}$ .

#### **4.3.1.2.2. Métodos**

##### **4.3.1.2.2.1. Análise da Composição Química dos Óleos Essenciais**

A análise da composição química dos óleos essenciais foi realizada por cromatografia em fase gasosa acoplada a espectrometria de massa (CG-EM). O equipamento utilizado foi o GC-17 A/MS, da Shimadzu. A ionização dos componentes foi realizada por impacto de elétrons, com energia de ionização de 70 eV. O espectrômetro foi operado no modo *scan* varrendo uma faixa de massas de 50-600 u.m.a. A temperatura da fonte de íons foi de 300°C. A separação cromatográfica foi realizada utilizando coluna capilar de sílica fundida DB-5 (30 m x 0,25 mm; 0,25  $\mu\text{m}$ ), com fluxo linear de 1,5 mL/min, com *split* na proporção de 1:10 e pressão de entrada 100,2 kPa. O volume injetado manualmente foi de 1  $\mu\text{L}$ . O gás de arraste foi o hélio. As condições de operação foram: temperatura do injetor e do detector de 250°C e 280°C, respectivamente, temperatura da coluna 70°C até 280°C a uma taxa de 10°C/min. A identificação dos constituintes foi realizada comparando os espectros obtidos, com os do banco de dados da biblioteca (Willey<sup>®</sup>/NBS).

##### **4.3.1.2.2.2. Características Físicas**

As características de aspecto, cor e homogeneidade, das formulações, foram avaliadas visualmente após 24 horas da obtenção.

##### **4.3.1.2.2.3. Determinação do pH**

O pH das formulações foi determinado utilizando-se um potenciômetro digital com eletrodo de vidro e sensor de temperatura, modelo Cambo HI 98129, da marca Hanna, previamente calibrado com soluções tampão pH 4,0 e 7,0 a uma temperatura de

$25 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ . O eletrodo de vidro foi introduzido diretamente no interior da formulação ( $\approx 8 \text{ mL}$ ). Os resultados foram expressos como a média de três lotes.

#### **4.3.1.2.2.4. Determinação da Condutividade**

A condutividade elétrica é uma ferramenta muito utilizada na determinação de domínios contínuos aquosos ou oleosos da formulação. Ela também é empregada na observação de modificações estruturais das microemulsões (ROSSI et al., 2007).

Para determinar o tipo do sistema O/A ou A/O, avaliou-se, primeiramente, a condutividade do solvente aquoso (água) e, em seguida, do solvente oleoso (miristato de isopropila). Em seguida, realizou-se a medida de condutividade do sistema microemulsionado sem os óleos incorporados (SE) e, por fim, as das formulações. Os resultados foram expressos como a média de três lotes.

As determinações de condutividade elétrica ( $\sigma$ ) foram realizadas em um condutivímetro modelo HI 98311, da marca Hanna. Foi determinada através da imersão da célula de vidro diretamente nas amostras. O equipamento foi previamente calibrado com solução padrão de  $146,9 \mu\text{S/cm}$ .

#### **4.3.1.2.2.5. Determinação do Tamanho, Índice de Polidispersão e Potencial Zeta das Gotículas**

Para confirmar a formação dos sistemas microemulsionados, as formulações ME-citratus e ME-nardus foram caracterizadas quanto ao tamanho de gotícula. Em sistemas nanométricos uma característica de grande relevância é o índice de polidispersão (IPD) que revela a homogeneidade da população das gotículas.

O potencial zeta, por sua vez, é um fator importante na previsão da estabilidade das amostras e na interação com as células (PEREIRA, 2008). Quanto maior for o valor absoluto deste potencial, mais carregada estará a superfície da gotícula. Portanto, pode-se inferir que essa concentração de cargas favorecerá as interações repulsivas entre as gotículas, levando a formação de sistemas estáveis, por diminuir a tendência a agregação, resultando em uma distribuição do tamanho das gotículas em suspensão mais uniforme (HANS; LOWMAN, 2002).

A técnica para determinação do diâmetro das formulações, o espalhamento dinâmico da luz, utiliza a flutuação da intensidade da luz espalhada por gotículas em suspensão, sob o movimento Browniano no tempo, para se obter a distribuição

hidrodinâmica do tamanho (XU, 2008). A partir desse princípio, as gotículas maiores movimentam-se mais lentamente e, conseqüentemente, a intensidade da luz flutua lentamente, enquanto que as gotículas menores movimentam-se mais rapidamente, resultando na flutuação mais rápida da intensidade da luz (AUTON, 2005).

O tamanho médio das gotículas, o IPD e o potencial zeta foram obtidos através de análise por espalhamento dinâmico de luz (DLS – *Dynamic Light Scattering*) usando o equipamento ZetaSizer<sup>®</sup> Nano-ZS90 (Malvern<sup>®</sup> Instruments), do Centro de Tecnologias Estratégicas do Nordeste (CETENE), da Universidade Federal de Pernambuco. Os resultados foram expressos como a média de três determinações.

#### **4.3.1.2.2.6. Estudos Térmicos**

Os estudos térmicos foram realizados usando um calorímetro modelo DSC-60, da Shimadzu, acoplado a um sistema de resfriamento Peltier, modelo EK90/SH sob atmosfera de nitrogênio 50 mL/min, utilizando como porta amostra um cadinho fechado de alumínio. O equipamento foi calibrado com zinco (PF = 419,5°C) como padrão. O sinal de fluxo de calor foi calibrado pelo calor de fusão do índio ( $28,59 \pm 0,3$  J/g). A massa das amostras foi de  $2,0 \pm 0,5$  mg. Os dados foram analisados a partir das curvas calorimétricas obtidas utilizando o *software* TasyS<sup>®</sup>, da Shimadzu. Os experimentos foram conduzidos com ciclos de resfriamento-aquecimento, as amostras foram inicialmente submetidas ao resfriamento (25°C a -50°C) na razão de 5°C/min, mantidas por 2 min a -50°C, em seguida, foram aquecidas até a temperatura de 250°C na razão de aquecimento de 10°C/min.

#### **4.3.1.2.2.7. Avaliação da Estabilidade Preliminar**

Para a avaliação da estabilidade preliminar as amostras foram submetidas ao teste de centrifugação e ao estresse térmico por DSC-60.

Os testes de centrifugação e estresse térmico são ferramentas bastante utilizadas nos estudos de estabilidade de sistemas dispersos, pois permitem observar, em curto espaço de tempo, possíveis instabilidades físico-químicas das formulações (BRIME et al., 2002; MORAIS, 2006; VELASCO et al., 2008).

Para o teste de centrifugação as amostras foram distribuídas em tubos de ensaio rosqueados e submetidas a ciclos de 1000, 2500 e 3500 rpm (70, 440 e 863 g, respectivamente) por 30 minutos em cada rotação a temperatura ambiente.

No teste de estresse térmico por DSC-60, o equipamento foi operado nas mesmas condições do equipamento do item 2.2.6. (Estudos Térmicos), nas seguintes condições experimentais:

1° ciclo: a partir da temperatura de 25°C até -50°C, permanecendo nesta temperatura por 5 minutos, e retornando a 25°C;

2° ciclo: a partir da temperatura de 25°C até -50° C, permanecendo nesta temperatura por 5 minutos, aquecendo até 40°C e retornando a 25°C;

3° ciclo: a partir da temperatura de 25°C até -50°C, permanecendo nesta temperatura por 5 minutos, aquecendo até 60°C e retornando a 25°C;

4° ciclo: a partir da temperatura de 25°C até -50°C, permanecendo nesta temperatura por 5 minutos, aquecendo até 80°C e retornando a 25°C;

As análises foram realizadas em triplicata.

#### **4.3.1.2.2.8. Doseamento dos Óleos Essenciais nas Microemulsões**

O doseamento dos óleos essenciais nas microemulsões foi obtido a partir da determinação do teor dos marcadores, citral para a ME-citratu e citronelal para a ME-nardus, usando a cromatografia gasosa acoplada ao detector de ionização de chama (CG-DIC). A metodologia analítica para a quantificação foi validada conforme o ítem 4.2.

#### **4.3.1.2.2.9. Cinética de Liberação**

##### **4.3.1.2.2.9.1. Preparo da Membrana**

Para a avaliação da cinética de liberação um dos passos fundamentais reside na seleção da membrana artificial de suporte à formulação. Esta deve constituir um suporte inerte relativamente à fase receptora, à substância ativa e à formulação, permitindo que a substância ativa se difunda livremente para a fase receptora, ou seja, que a velocidade de passagem através da membrana seja superior à velocidade com que a substância é liberada pela matriz (HIGUCHI, 1962).

Foram testadas 3 tipos de membranas artificiais: PVDF, PTFE e NC, todas com poro de 0,45 µm e previamente condicionadas com o meio receptor por um período de 24 horas.

#### 4.3.1.2.2.9.2. Seleção do Meio Receptor

A seleção de um meio receptor apropriado é um fator crítico para o sucesso do experimento de liberação de fármacos (SHAH et al., 2005). A composição do meio receptor deve demonstrar ser capaz de manter a condição *sink* à temperatura de 32°C ( $\pm$  0,5), apresentar-se como solução tampão com pH fisiológico para princípios ativos solúveis em água ou ainda meio hidroalcoólico para fármacos lipofílicos (U.S. FDA/CDER, 1997).

Quando a concentração do fármaco dissolvido no meio de liberação é menor que 10% da sua concentração de saturação, diz-se que o sistema está operando sob condição *sink* (SINKO, 2008). As amostras coletadas devem apresentar um mínimo de 5 tempos de coletas diferentes durante todo o período para determinação do fluxo da liberação (SHAH et al., 1999).

#### 4.3.1.2.2.9.3. Montagem das Células de Franz

O compartimento receptor das células de Franz foi completamente preenchido com solução receptora. As membranas foram dispostas na célula de modo que ficassem em contato com a solução receptora sem a formação de bolhas. E no compartimento doador foi colocado 500  $\mu$ L da formulação. O sistema foi mantido sob agitação (300 rpm) por meio de barra magnética. O compartimento receptor foi ocluído por papel filme. O sistema foi mantido sob agitação (300 rpm) por meio de barra magnética a temperatura de 32°C  $\pm$  2°C (Figura 1).

**Figura 1** – Sistema de células de difusão de Franz adaptado.



#### 4.3.1.2.2.9.4. Coleta e Quantificação das Amostras

O período de coleta para o perfil de liberação foi: 1,0; 2,0; 3,0; 4,0; 5,0; 6,0; 7,0; 8,0; 12 e 24 horas. O volume total da fase receptora foi substituído a cada amostragem com solução hidroalcoólica para manutenção das condições *sink* do sistema. As alíquotas foram quantificadas por CG-DIC, a partir de uma curva controle para o citral e citronelal nas concentrações de 150, 200 e 250  $\mu\text{g/mL}$  e 50, 100 e 150  $\mu\text{g/mL}$ , respectivamente.

As análises foram repetidas para cada formulação, em triplicata. A quantidade liberada de óleo essencial acumulada no compartimento receptor, em cada tempo, foi calculada levando-se em consideração o volume total da célula (5 mL), a quantidade de fármaco retirada nas coletas anteriores e a área de exposição (1,15  $\text{cm}^2$ ) do compartimento doador.

#### 4.2.1.2.2.9.5. Análise da Cinética de Liberação *In Vitro*

Para a avaliação da cinética de liberação dos óleos nos sistemas, os resultados de liberação *in vitro* foram compilados em gráficos de dispersão xy, característicos de três modelos de cinética:

- Ordem zero: quantidade liberada por área ( $\mu\text{g/cm}^2$ ) *versus* tempo (h);
- Higuchi: quantidade liberada por área ( $\mu\text{g/cm}^2$ ) *versus* raiz do tempo (h);
- Primeira ordem: log da quantidade liberada por área ( $\mu\text{g/cm}^2$ ) *versus* tempo (h).

A partir da análise de regressão linear, determinou-se o coeficiente de correlação ( $r^2$ ) para cada modelo de cinética. O modelo que apresentou maior valor de  $r^2$  foi o selecionado. O valor da velocidade de liberação (J) corresponde à inclinação (a) da porção linear do modelo de cinética selecionado (COSTA; LOBO, 2001).

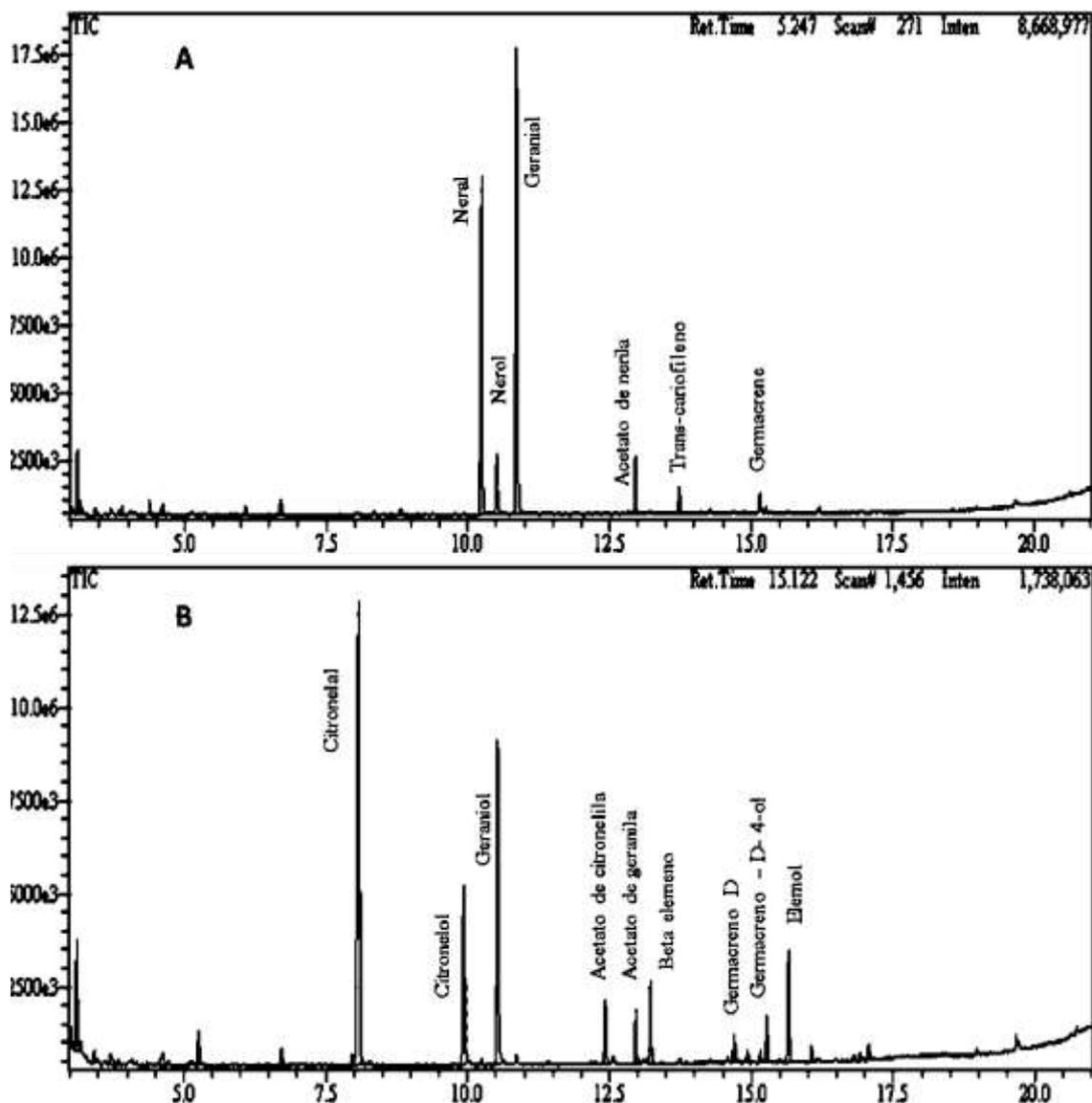
O *lag time*, é definido como o tempo necessário para que a passagem de uma substância através de uma membrana atinja o equilíbrio (AULTON, 2005), sendo obtido a partir do perfil cinético selecionado, correspondendo a extrapolação até o eixo X da regressão linear.

#### 4.3.1.3. Resultados e Discussão

##### 4.3.1.3.1. Análise da Composição Química dos Óleos Essenciais

A análise química dos óleos essenciais pode ser visualizada na Figura 2. Os dados mostram os principais constituintes do óleo essencial de *C. citratus*: trans-isômero citral A ou geranial (40,1%), cis-isômero citral B ou neral (32,1%) e geraniol (6,5%). A mistura dos isômeros neral e geranial, correspondem ao monoterpene citral, representando o constituinte majoritário do óleo essencial *C. citratus* (BASSOLÉA et al., 2011; OLIVERO-VERBEL et al., 2010). Para o óleo essencial *C. nardus* os constituintes majoritários foram o citronelal (38,60%), geraniol (23,42%) e citronelol (13,90%) (OLIVEIRA et al., 2010).

**Figura 2** – Cromatogramas CG-EM dos óleos essenciais *C. citratus* (A) e *C. nardus* (B), com os principais constituintes identificados.



#### 4.3.1.3.2. Características Físicas

Após 24 horas da preparação, as formulações apresentaram características visuais de sistemas microemulsionados, ou seja, aspecto límpido e translúcido, coloração amarelada e homogêneo (Figura 3) (MORAIS, 2006).

**Figura 3** – Formulações das microemulsões de *C. citratus* e de *C. nardus* após 24 horas da obtenção.



#### 4.3.1.3.3. Determinação do pH e Condutividade

O pH das amostras avaliadas, conforme Tabela 1, foi considerado satisfatório para a administração tópica. O pH cutâneo apresenta-se levemente ácido, o qual é fundamental para a proteção bacteriana e fungicida. As formulações de administração tópica devem ser compatíveis com relação a esses valores de pH, caso contrário, podem expor a pele a entrada de microrganismos. (LEONARDI; GASPAR; CAMPOS, 2002). A ação protetora da pele e cicatrização de feridas são dependentes do pH e da higidez das células do estrato córneo, quando são prejudicados, a cicatrização de feridas é retardada (SCHREMI et al., 2010).

A determinação da condutividade é um parâmetro sensível no controle da qualidade das microemulsões (AULTON, 2005). De acordo com as medidas de condutividade conforme Tabela 1, observou-se que a incorporação dos óleos não provocou uma inversão de fases na formulação.

**Tabela 1** – Resultados do pH e da condutividade dos excipientes e das formulações sem e com a incorporação dos óleos essenciais.

<b>Amostra</b>	<b>pH ± DP</b>	<b>Condutividade ± DP</b>
<b>H<sub>2</sub>O</b>	6,0 ± 0,5	1,8 ± 0,3
<b>Miristato de isopropila</b>	-	0,0
<b>SE*</b>	5,8 ± 0,2	46 ± 1,0
<b>ME-citratus</b>	5,1 ± 0,6	48 ± 1,0
<b>ME-nardus</b>	5,8 ± 0,3	53 ± 3,0

\*SE (Sistema emulsionado sem a incorporação dos óleos essenciais); DP (Desvio padrão).

#### 4.3.1.3.4. Tamanho da Gotícula, Índice de Polidispersão e Potencial Zeta

Os resultados do tamanho da gotícula das formulações estão apresentados na Tabela 2. Os dados confirmaram a formação de sistemas com diâmetro em escala nanométrica, com gotícula inferior a 200 nm (ESPOSITO et al., 2003).

Com os valores dos IPD das formulações estudadas contidos na Tabela 2, pode ser observado que as mesmas apresentaram uma distribuição de gotículas moderadamente homogênea. Embora não exista uma correlação linear entre um valor do IPD e uma monodispersão da amostra verdadeira, em uma escala de 0 a 1, IPD menor que 0,1 tem sido associado a um sistema monodisperso, com alta homogeneidade na população de gotículas, sugerindo uma distribuição de tamanho monomodal. Por outro lado, valores altos de IPD sugerem uma distribuição de tamanho mais ampla ou polimodal (CALVO, VILA-JATO; ALONSO, 1996; GAUMET et al., 2008).

As gotículas nas formulações apresentaram potencial zeta superior ao módulo de 30 mV (Tabela 2), o que sugere uma repulsão entre as gotículas satisfatória favorecendo a formação de sistemas estáveis. Para garantir a estabilidade das formulações acredita-se que o potencial zeta deve ser superior ao módulo de 30mV, porém esta regra não pode ser aplicada irrestritamente, pois existem algumas formulações com estabilizantes que possuem um potencial zeta menor e nem por isso não são estáveis (FREITAS, MULLER, 1998).

**Tabela 2** – Resultados do tamanho da gotícula, índice de polidispersão e potencial zeta das formulações.

Formulação	Tamanho da gotícula (nm) ± DP	Índice de polidispersão ± DP	Potencial zeta ± DP
ME-citratus	163,5 ± 4,2	0,268 ± 0,003	-38,3 ± 0,45
ME-nardus	98,1 ± 5,9	0,328 ± 0,011	-52,8 ± 1,12

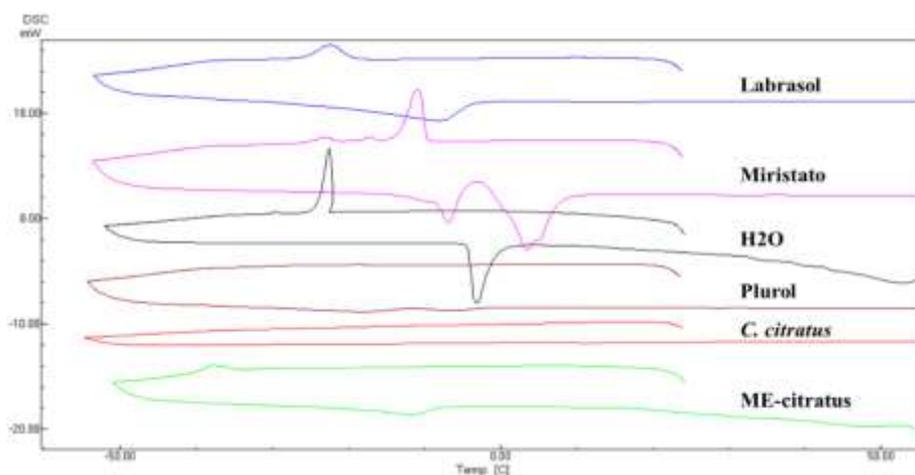
DP (Desvio padrão).

#### 4.3.1.3.5. Estudos Térmicos

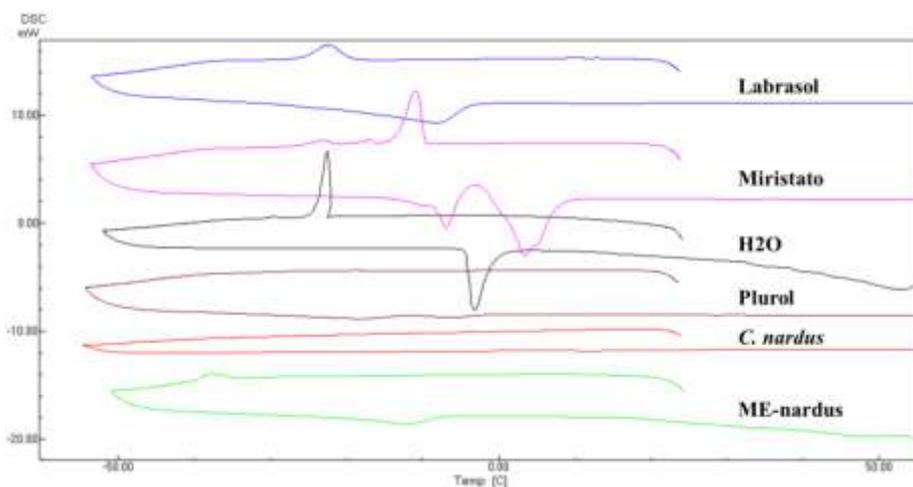
Nas Figuras 4 e 5 observam-se as curvas calorimétricas dos excipientes e das formulações de ME-citratus e ME-nardus. Para a curva DSC do labrasol, observa-se um pico exotérmico na temperatura de  $-24^{\circ}\text{C}$ , correspondendo a temperatura de cristalização do tensoativo. A curva do plurool não apresenta pico de cristalização no resfriamento até a temperatura de  $-50^{\circ}\text{C}$ . Na curva da água pura observamos o pico exotérmico característico de cristalização da água na temperatura de  $-19^{\circ}\text{C}$ .

No entanto as ME-citratus e ME-nardus não apresentaram os picos exotérmicos característicos dos constituintes da formulação, o que sugere não ser possível a visualização das características individuais destes compostos, possivelmente devido à ligações coesas formadas na obtenção dos sistemas (ALANY et al., 2001; PODLOGAR et al., 2004). Estes resultados corroboram com a obtenção de um sistema microemulsionado.

**Figura 4** – Curvas calorimétricas em ciclo de resfriamento/aquecimento dos excipientes isolados e da ME-citratus.



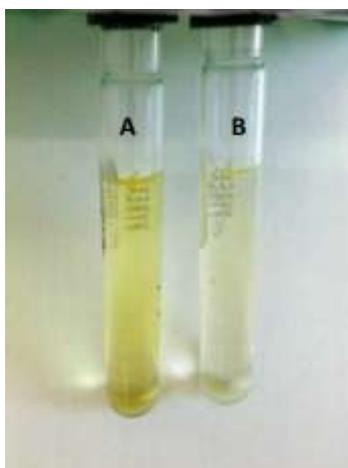
**Figura 5** – Curvas calorimétricas em ciclo de resfriamento/aquecimento dos excipientes isolados e da ME-nardus.



#### 4.3.1.3.6. Avaliação da Estabilidade Preliminar

Os resultados obtidos para o teste de estabilidade por centrifugação mostrou que as amostras foram estáveis após a centrifugação nas três rotações avaliadas: 1000, 2500 e 3500 rpm (70, 440 e 863 g, respectivamente). Na Figura 6 observamos as duas formulações após o teste na rotação mais elevada (863 g). Podemos observar que o sistema manteve-se homogêneo, apresentando aspecto límpido, transparente e translúcido.

**Figura 6** – Imagem da ME-citratus (A) e ME-nardus (B) após centrifugação na rotação máxima de 863 g.



As curvas DSC-60 obtidas no teste de estresse térmico mostraram que as formulações ME-citratus e ME-nardus, não apresentaram picos característicos dos constituintes isolados, sugerindo que as ligações formadas entre estes constituintes durante a obtenção dos sistemas microemulsionados permaneceram estáveis após os ciclos de resfriamento/aquecimento.

#### 4.3.1.3.7. Doseamento dos Óleos Essenciais nas Microemulsões

O doseamento das microemulsões foi realizado em relação aos marcadores citral e citronelal, constituintes majoritários dos óleos *C. citratus* e *C. nardus*, respectivamente. Os resultados foram obtidos seguindo metodologia validada apresentada no Capítulo 5. A microemulsão ME-citratus (44,9 mg de óleo essencial *C. citratus*), equivalente a 30,08 mg de citral, apresentou na quantificação concentração de 29,58 mg ( $\pm 0,75$ ) de citral, correspondendo a 98,34% deste marcadores na formulação. A microemulsão ME-nardus (44,5 mg de óleo essencial *C. nardus*), equivalente a 16,92 mg de citronelal, apresentou na quantificação uma concentração de 16,98 mg ( $\pm 0,64$ ) de citronelal, correspondendo a 99,67% deste marcador na formulação.

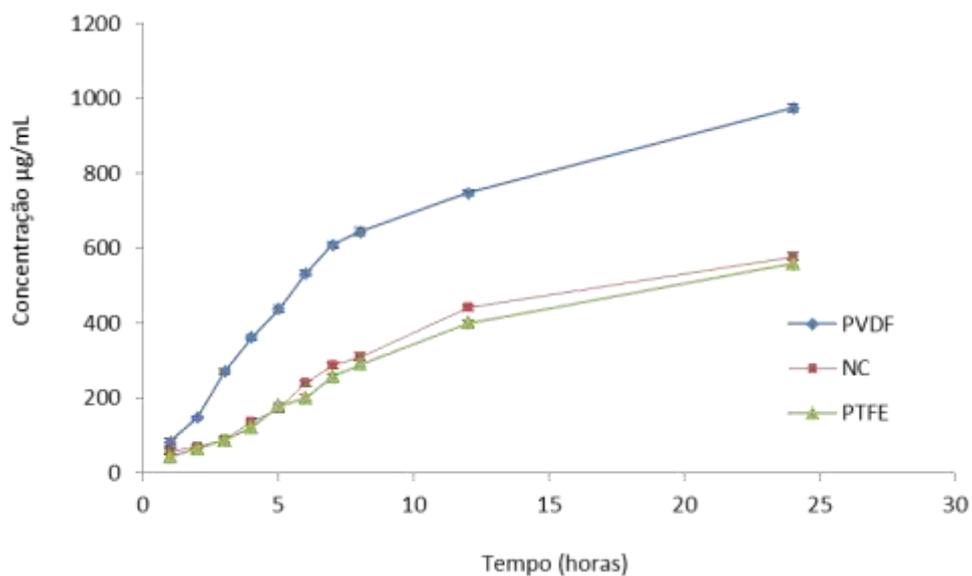
#### 4.3.1.3.8. Cinética de Liberação

Para o estudo da cinética de liberação, devido as características hidrofóbicas dos óleos essenciais estudados, o meio escolhido foi solução hidroalcoólica, na proporção 50:50, v/v.

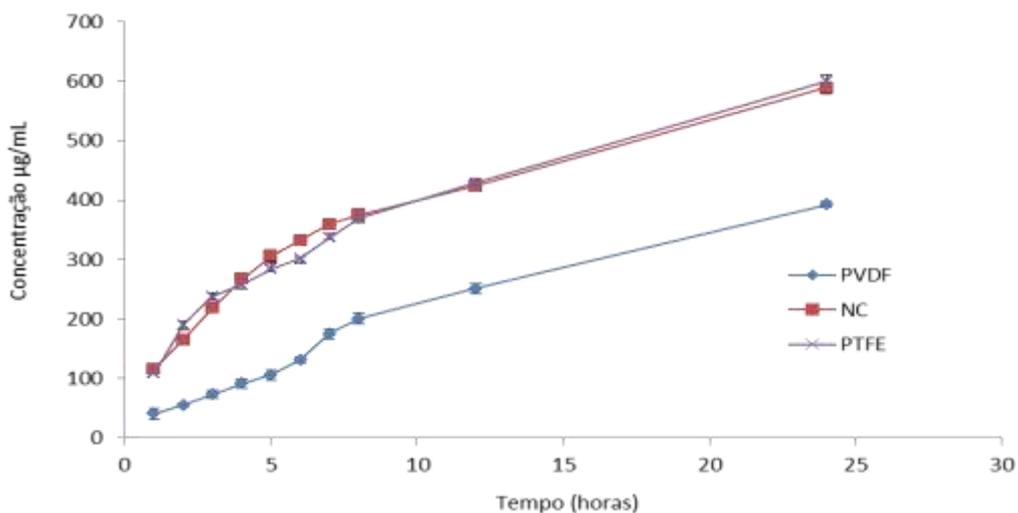
A solubilidade do óleo essencial *C. citratus* no meio receptor foi de 30  $\mu\text{L/mL}$  ( $\approx 26,94 \text{ mg/mL}$ ) e de 40  $\mu\text{L/mL}$  (35,64 mg/mL) para o óleo essencial *C. nardus*. A quantidade dos marcadores na solução receptora atingida durante este estudo não excedeu 1,5 mg/mL, além disso a cada tempo de coleta toda a fase receptora foi retirada da célula para garantia da condição *sink* do sistema.

Nas Figuras 7 e 8 observamos a quantidade liberada de citral e citronelal ao longo do tempo do ensaio para as três membranas estudadas.

**Figura 7** – Representação gráfica das quantidades acumulada de citral liberadas através das membranas de PVDF, NC e PTFE, em cada tempo de coleta, a partir da ME-citratus.



**Figura 8** – Representação gráfica das quantidades acumulada de citronelal liberadas através das membranas de PVDF, NC e PTFE, em cada tempo de coleta, a partir da ME-nardus.



Para a melhor compreensão do comportamento cinético de liberação foram aplicados aos dados os modelos matemáticos de ordem 0, primeira ordem e Higuchi a cada membrana estudada (Tabelas 3 e 4).

**Tabela 3** – Coeficiente de correlação para a liberação do citral a partir das três membranas estudadas.

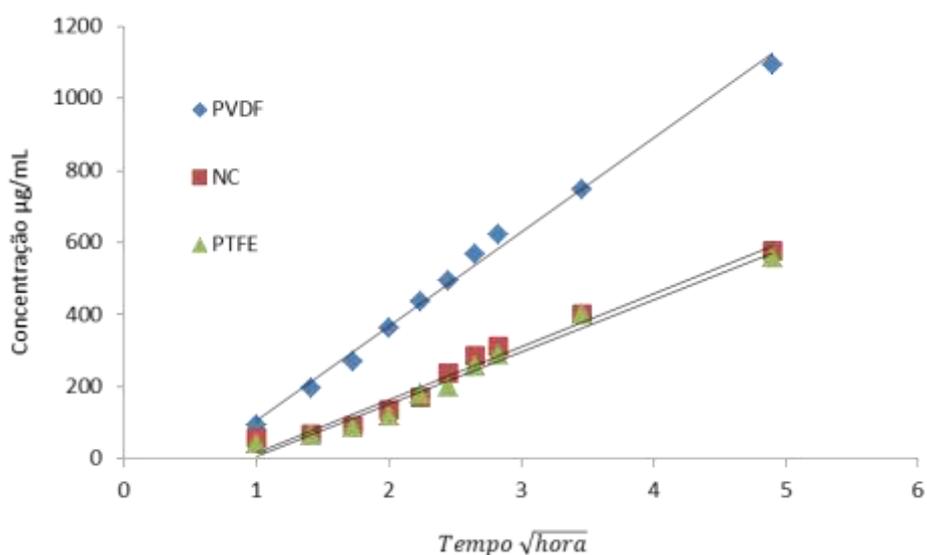
Membrana	Ordem 0	Primeira ordem	Higuchi
PVDF	0,8227	0,6204	0,9925
NC	0,9080	0,7064	0,9737
PTFE	0,9322	0,7133	0,9779

**Tabela 4** – Coeficiente de correlação para a liberação do citronelal a partir das três membranas estudadas.

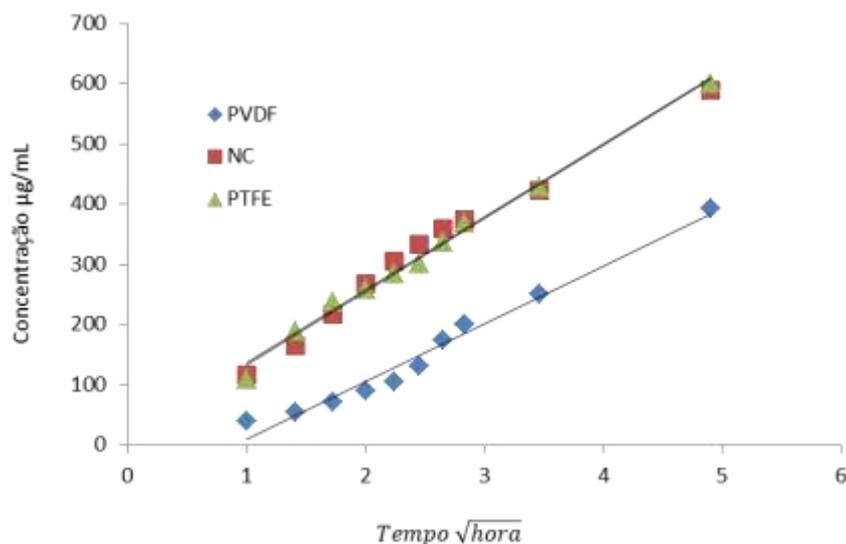
Membrana	Ordem 0	Primeira ordem	Higuchi
PVDF	0,9625	0,7811	0,9764
NC	0,8862	0,6830	0,9815
PTFE	0,9255	0,7101	0,9927

Após a regressão linear nos modelos matemáticos, observamos que os valores dos coeficientes de correlação apresentaram-se mais próximos de 1 para o modelo cinético de Higuchi, demonstrando que na ME-citratu e ME-nardu a difusão do citral e citronelal, respectivamente, é controlada pelo sistema (Figuras 9 e 10) (TOSCANO et al., 1997).

**Figura 9** – Modelo cinético de Higuchi para a liberação do citral nas três membranas estudadas.



**Figura 10** – Modelo cinético de Higuchi para a liberação do citronelal nas três membranas estudadas.



A partir da determinação do modelo cinético foi calculada a velocidade de liberação e o tempo necessário para o equilíbrio da difusão através de cada membrana, o *lag time*. Os resultados estão apresentados nas Tabelas 5 e 6.

**Tabela 5** – Velocidade de liberação e *lag time* do citral através das membranas pelo método de Higuchi.

Membranas	Velocidade ( $\mu\text{g}/\text{cm}^2/\sqrt{h}$ )	<i>Lag time</i> (horas)
PVDF	264,30	0,31
NC	146,89	0,87
PTFE	144,67	0,95

**Tabela 6** – Velocidade de liberação e *lag time* do citronelal através das membranas pelo método de Higuchi.

Membrana	Velocidade ( $\mu\text{g}/\text{cm}^2/\sqrt{h}$ )	<i>Lag time</i> (horas)
PVDF	75,87	0,89
NC	121,29	0,09
PTFE	121,74	0,13

A membrana PVDF para a ME-citratu foi a que apresentou menor resistência a liberação do citral, com velocidade de liberação de  $264,30 \mu\text{g}/\text{cm}^2/\sqrt{h}$ . Para as

membranas NC e PTFE, as velocidades foram de 146,89 e 144,67  $\mu\text{g}/\text{cm}^2/\sqrt{h}$ , respectivamente, confirmando uma maior resistência das mesmas (Tabela 5). A maior resistência das membranas PTFE e NC poderá estar associada ao seu caráter hidrofílico, em oposição à lipofilia característica do citral.

Os resultados obtidos para o *lag time* de 0,87 e 0,95 horas para NC e PTFE, respectivamente, corroboram com a observação da resistência destas membranas na liberação do citral. Normalmente, os valores de *lag time*, obtidos pelo intercepto com o eixo X correspondem a uma pequena fração de uma hora (FDA, 1997) (Tabela 5).

Para a ME-nardus as membranas de menor resistência foram as NC e PTFE, com velocidades de liberação praticamente iguais, 121,29 e 121,74  $\mu\text{g}/\text{cm}^2/\sqrt{h}$ , respectivamente. Para a membrana PVDF a velocidade foi de 75,87  $\mu\text{g}/\text{cm}^2/\sqrt{h}$  e *lag time* de 0,89 h (Tabela 6). Neste caso, a maior resistência foi a da membrana hidrofóbica que pode ser explicada pela característica intrínseca do complexo dos constituintes do óleo essencial, que não é definida pelo citronelal já que este corresponde apenas 37,89% do óleo.

A seleção da membrana mais adequada pode ser efetuada com base na melhor relação de linearidade entre a quantidade do marcador liberado e a  $\sqrt{t}$ , para cada uma das formulações em estudo. Podemos concluir que dos três sistemas *in vitro* de avaliação da quantidade dos marcadores dos óleos essenciais liberados a partir da microemulsão, aqueles que utilizam membranas de PVDF para o citral e PTFE para o citronelal, foram os mais adequados para caracterizar a velocidade e extensão de liberação *in vitro* destes marcadores a partir da matriz.

#### 4.3.1.4. Conclusão

A análise dos constituintes dos óleos essenciais *C. citratus* e *C. nardus* apresentaram o citral e citronelal, respectivamente, como os constituintes majoritários dos óleos. As características organolépticas e de tamanho de partículas confirmaram a obtenção de sistemas microemulsionados. Os resultados térmicos DSC60 corroboraram com a obtenção da microemulsão. As ME apresentaram pH condizente com formulações de aplicação tópica. A avaliação da estabilidade preliminar revelou que as microemulsões são sistemas estáveis. As ME apresentaram cinética de liberação de acordo com o modelo de Higuchi e as membranas PVDF para o citral e PTFE para o

citronelal foram as mais adequadas para caracterizar a velocidade e extensão de liberação *in vitro* dos marcadores a partir da matriz estudada.

## Referências

ALANY, R. G.; RADES, T.; NICOLL, J.; TUCKER, I. G.; DAVIES, N. M. W/O microemulsions for ocular delivery: evaluation of ocular irritation and precorneal retention. *Journal of Controlled Release*, v. 111, n. 1-2, p. 145-152, 2006.

BEMVINDO, C.S. Estudo Comparativo da Liberação e Penetração Cutânea de Nitrato de Miconazol de Emulsões Tópicas Comerciais. 2006. 110 p. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro. 2006.

BOUCHEMAL, K; BRIANÇON, S.; PERRIER, E.; FESSI, H. Nano-emulsion formulation using spontaneous emulsification: solvent, iol and surfactant optimization. *International Journal of Pharmaceutics*, v.280, n.1-2, 241-251.

BRIME, B.; MORENO, M.A.; FRUTOS, G.; BALLESTEROS, M.P.; FRUTOS, P. Amphotericin B in oil-water lecithin-based microemulsion: formulation and toxicity evaluation. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 91, n. 4, p. 1178-1185, 2002.

CALVO, P.; VILA-JATO, J. L.; ALONSO, M. J. Comparative *in vitro* evaluation of several colloidal systems, nanoparticles, nanocapsules, and nanoemulsions, as ocular drug carriers. *J. Pharm. Sci.* v. 85, p. 530- 536, 1996.

CONSTANTINIDES PP, YIV SH. Particle-Size Determination of Phase-Inverted Water-in-Oil Microemulsions under Different Dilution and Storage-Conditions. *Int J Pharm.* Mar 7;115(2):225-34, 1995.

COSTA, P.; LOBO, J. M. Modeling and comparison of dissolution profiles. *European Journal of Pharmaceutical Science*, v. 13, p. 123-133. 2001.

COSTA, P.; LOBO, J. M. S. Modeling and comparison of dissolution profiles. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, v.13, p.123-133, 2001.

DAMASCENO, B.P.G.L. SILVA, J.A. ; OLIVEIRA, E.E.; SILVEIRA, W.L.L.; ARAÚJO, I.B; OLIVEIRA, A.G.; EGITO, E.S.T. *Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada*,;32(1):9-18 2011.

DIXIT, R.P.; NAGARSENKER, M.S.; Optimized microemulsions and solid microemulsion systems of simvastatin: characterization and *in vivo* evaluation. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 99, n. 12, p. 4892 – 4902, 2010.

DOMINGO C., SAURINA J. An overview of the analytical characterization of nanostructured drug delivery systems: Towards green and sustainable pharmaceuticals: A review *Analytica Chimica Acta* 744, 8– 22, 2012.

FORMARIZ TR, SARMENTO VHV, SILVA-JUNIOR AA, SCARPA MV, SANTILLI CV, OLIVEIRA AG. Doxorubicin biocompatible O/W microemulsion stabilized by mixed surfactant containing soya phosphatidylcholine. *Colloids Surf, B.* 1;51(1):54-61, 2006.

FORMARIZ, T.P; URBAN, M.C.C.; JÚNIOR, A.A.S.; GREMIÃO, M.P.D.; OLIVEIRA,A.G. Microemulsões e fases líquidas cristalinas como sistemas de liberação de fármacos. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*, v. 41, n. 03, p. 301 – 313, jul./set. 2005.

HADGRAFT, J.; LANE, M.E. Skin, the final frontier. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 224, p. 1-18, 2001.

HANS, M.L.; LOWMAN, A.M. Biodegradable nanoparticles for drug delivery and targeting. *Current Opinion in Solid State & Material Science*, v.6, p. 319 - 327, 2002.

HIGUCHI, W. I. Analysis of data on the medicament release from ointments. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 51, n. 8, p. 802-804, 1962.

JAIN, J.; FERNANDES, C.; PATRAVALE, V. Formulation development of parenteral phospholipid-based microemulsion of etoposide. *AAPS Pharm Sci Tech*, v. 11, n. 2, p.826-831, 2010.

KREILGAARD, M. Influence of microemulsions on cutaneous drug delivery. *Advanced Drug Delivery Reviews*, v. 54, n. 1, p. 77-98, 2002.

LAWRENCE, M.J; REES, G.D. Microemulsion-based media as novel drug delivery systems. *Advanced Drug Delivery Reviews*, v.45, p. 89-121, 2000.

MAGHRABY, G.M.E. Transdermal delivery of hydrocortisone from eucalyptus oil microemulsion: Effects of cosurfactants. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 355, p. 285–292, 2008.

MORAIS, JM. ET AL. Physicochemical Characterization of Canola Oil/Water Nanoemulsions obtained by Determination of Required HLD Number and Emulsion Phase Inversion Methods. *Journal of Dispersion Science and Technology.* 27 (1) p.109-115, 2006.

OLIVEIRA, M. M. M. *et al.* Disinfectant action of *Cymbopogon* sp. essential oils in different phases of biofilm formation by *Listeria monocytogenes* on stainless steel surface. *Food Control*, v. 21, n. 04, p.549-553, 2010.

PEREIRA, L.O.; ARTENI, N.S.; PETERSEN, R.C.; ROCHA, A.P.; ACHAVAL, M., NETTO, C.A. Effect of daily environmental enrichment on memory deficits and brain injury following neonatal hypoxia-ischemia in the rat. *Neurobiology of learning and memory* v. 87, p. 101-108, 2007.

PODLOGAR, F.; GASPERLIN, M.; TOMSIC, M.; JAMNIK, A.; ROGAC, M.B. Structural characterization os water-tween 40®/Imwitor 308®-isopropil myristate

microemulsions using different experimental methods. *International journal of pharmaceutics*, v.276, n. 1, p.115—128, 2004.

ROSSI, C.G.F.T; DANTAS, T.N.C; NETO, A.A.D ; MACIEL, M.A.M. Microemulsões: Uma abordagem básica e perspectivas para aplicabilidade industrial. *Revista da Universidade Rural de Seropédica Ciências Exatas e da Terra*, v.26, n. 1-2, p. 45-66, jan./dez. 2007.

SHAH, V. P.; ELKINS, J. S.; WILLIAMS, R. L. Evaluation of the Test system Used for *In vitro* Release of Drugs for Topical Dermatological Drug products. *Pharmaceutical Development and Technology*, v. 4, n. 3, p. 377-385, 1999.

SINTOV, A.C.; BOTNER, S. Transdermal drug delivery using microemulsion and aqueous systems: influence of skin storage conditions on the *in vitro* permeability of diclofenac from aqueous vehicle systems. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 311, p. 55–62, 2006.

SMITH, E. M.; RITCHIE, J. M.; YANKOWITZ, J.; WANG, D.; TUREK, L. P.; HAUGEN, T. H. HPV prevalence and concordance in the cervix and oral cavity of pregnant women. *Infectious Diseases in Obstetrics and Gynecology*, 12:45-56, 2004.

SONNEVILLE A. O., SIMONNET J. T.; L'ALLORET F. Nanoemulsions: a new vehicle for skincare products. *Advances in Colloid and Interface Science*, Amsterdam, v. 108-109; p. 145-149, 2004.

SOUZA.,V.M. Ativos dermatológicos: um guia dos novos ativos dermatológicos utilizados na farmácia de manipulação, para médicos e farmacêuticos. São Paulo: Tecnopress, p. 214, 2003.

STORPIRTIS, S.; GONÇALVES, J.E.; CHIANN,C.; GAIM.N. *Ciências Farmacêuticas: Biofarmacotécnica*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2009.321p.

TOSCANO, C.; CAMPOS, R.; BICA, A.; FARINHA, A. R. Sensibilidade dos ensaios de difusão *in vitro* na detecção de alterações induzidas pelo efeito da temperatura em formulações semi-sólidas de cetoconazol. *Revista Portuguesa de Farmácia*, v. 67, n. 4, Lisboa, 1997.

VELASCO, M.V.R.; BALOGH, T.S.; PEDRIALI, C.A.; SARRUF, F.D.; PINTO, C.A.S.O.; KANEKO, T.M.; BABY, A.R. Associação da rutina com p-metoxicinamato de octila e benzofenona-3: avaliação *in vitro* da eficácia fotoprotetora por espectrofotometria de refletância. *Lat. Am. J. Pharm.*, Buenos Aires, v.27, n.1, p.23-27, 2008.

XU, R. Progress in nanoparticles characterization: Sizing and zeta potencial measurement. *Particuology*, v. 6, p. 112-115, 2008.

YUAN, Y.; LI, S.M.; MO, F.; ZHONG, D.F. Investigation of microemulsion system for transdermal delivery of meloxicam. *International Journal of Pharmaceutics*, v.321, p. 117-123, 2006.

#### 4.4. Avaliação da atividade Leishmanicida e Citotoxicidade

##### 4.4.1. Avaliação da Atividade Leishmanicida e Citotoxicidade de Óleos Essenciais de *Cymbopogon citratus* e *Cymbopogon nardus* Isolados e Microemulsionados

###### 4.4.1.1. Introdução

A leishmaniose é uma das doenças mais negligenciadas do mundo em termos de descoberta e pesquisa de novos medicamentos (FREITAS-JUNIOR et al., 2012). O controle da infecção faz uso de medicamentos altamente tóxicos, com problemas de resistência, preços elevados e longo tempo de duração de tratamento. Recentemente melhorias na redução do tempo e do custo do tratamento foram alcançadas pela utilização de terapias combinadas (PHAM et al., 2013). No entanto, a busca por novos agentes terapêuticos para o tratamento da leishmaniose mais seguros, menos dispendiosos e mais eficazes, ainda é necessário.

Muitas substâncias derivadas das plantas são fontes atraentes para desenvolvimento de novos agentes terapêuticos, sobretudo os óleos essenciais. Entre estes produtos naturais, os monoterpenos são os componentes majoritários, e os efeitos de muitas plantas medicinais têm sido atribuídos a eles (GHERLARDINI et al., 2001; SOUSA et al., 2006; SOUSA et al., 2007; GUIMARÃES et al., 2010). Com base no amplo uso terapêutico de diversas plantas, muitos estudos têm-se concentrado nos perfis fitoquímicos para correlacionar os constituintes às propriedades farmacológicas dos extratos vegetais (DUARTE et al., 2005).

O óleo essencial de *Cymbopogon citratus* e o monoterpeno citral, seu constituinte majoritário, tem demonstrado importantes atividades biológicas antifúngica, bactericida, antisséptica, antioxidante, antimicrobiana, sedativa e leishmanicida (OLOYEDE, 2009; PEREIRA et al., 2009; NAIK et al., 2010; MATASYOH et al., 2011; AHMAD KHAN et al., 2012).

O óleo essencial de *Cymbopogon nardus* apresenta atividade repelente a insetos e também ação fungicida e bactericida (BILLERBECK et al., 2001; WONG, 2005; TRONGTOKIT, 2005; MEDICE, 2007). Possui como um dos constituintes majoritários o monoterpeno citronelal. Diversos estudos relatam diferentes atividades biológicas do citronelal: antioxidante (SINGH et al., 2012), antibacteriana (ELAISSI et al., 2011) e

efeito antinociceptivo (QUINTANS-JÚNIOR et al., 2011). No entanto, a atividade leishmanicida do óleo de *C. nardus* e citronelal é pouco conhecida.

A melhoria das propriedades terapêuticas de compostos derivados de plantas por meio de sua incorporação em sistemas de liberação constitui-se uma estratégia importante na obtenção de novos medicamentos. Os sistemas de liberação de fármacos apresentam inúmeras vantagens, entre elas a capacidade de prolongar e controlar a liberação da substância ativa, proteger as moléculas contra degradação no meio fisiológico, veicular fármacos hidrofóbicos, evitar a evaporação de substâncias voláteis e conduzir à redução dos efeitos colaterais indesejáveis decorrentes das flutuações plasmáticas causadas pela administração de várias doses diárias do medicamento ou da ampla distribuição do fármaco no organismo (FONSECA et al., 2002; GUPTE; CIFTCI, 2004).

As microemulsões (MEs) formam sistemas reservatórios, com capacidade de modificar profundamente a velocidade de liberação de fármacos, oferecendo benefícios que incluem o aumento da solubilidade e absorção e controle da biodisponibilidade de fármacos. Como sistemas reservatórios podem alterar os parâmetros farmacocinéticos, aumentar o índice terapêutico e conseqüentemente diminuir a toxicidade e aumentar a eficácia clínica de fármacos (DALMORA et al., 2001; FORMARIZ et al., 2005).

Diante disto, muita atenção tem sido dada às MEs por sua capacidade em aumentar a eficácia terapêutica de fármacos, permitindo a redução da dose administrada e minimizando os efeitos colaterais potenciais dos fármacos (FORMARIZ, 2004).

O objetivo deste trabalho foi avaliar a atividade leishmanicida e a citotoxicidade dos óleos essenciais *C. citratus* e *C. nardus* isolados e quando incorporados em microemulsões.

#### **4.4.1.2. Material e Métodos**

##### **4.4.1.2.1. Material**

Os óleos essenciais de *C. citratus* e *C. nardus* foram obtidos da Phytoterápica (São Paulo, Brasil). Os marcadores citral e citronelal foram obtidos da Sigma-Aldrich (UK).

As formulações obtidas pela incorporação dos óleos essenciais *C. citratus* (ME-citratus) e *C. nardus* (ME-nardus), cada uma com 5% de óleo incorporado, foram preparadas no Núcleo de Desenvolvimento Farmacêutico e Cosmético (NUDFAC) da

Universidade Federal de Pernambuco (UFPE) e gentilmente cedidas pela Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Leila Leal.

#### **4.4.1.2.2. Preparo da Amostra**

Para a atividade leishmanicida foi preparada uma solução estoque de 100 µL de cada amostra em 300 µL de Dimetilsulfóxido (DMSO) e 10 mL de água destilada. Em seguida as amostras foram diluídas em água destilada para obter as seguintes concentrações: 8,63; 17,27; 25,90; 34,54 e 43,17 µg/mL de citral no óleo *C. citratus* isolado e no sistema microemulsionado ME-citratus; e 8,56; 17,13; 25,69; 34,60 e 42,83 µg/mL para o citronelal no óleo *C. nardus* isolado e no sistema microemulsionado ME-nardus.

Para o estudo da citotoxicidade as amostras foram preparadas seguindo a mesma metodologia dos óleos essenciais, sendo obtidas as concentrações de 10,0; 25,0; 50,0; 75,0 e 100,0 µL/mL.

#### **4.4.1.2.3. Atividade Leishmanicida**

Os ensaios de atividade leishmanicida foram realizados no Laboratório de Ensaio Antiparasitário e de Radiologia Experimental, localizado no Centro de Biociências da UFRN. As formas promastigotas de *Leishmania chagasi* (VLE522) foram gentilmente cedidas pela Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Louisianny Guerra da Rocha.

Em tubos de ensaios contendo  $2-4 \times 10^6$  células/mL do protozoário *Leishmania chagasi* na fase de crescimento exponencial (procíclicas) e suspensas em meio de cultura LIT (Infusão de Fígado e Triptose) acrescido de 20% de Soro Fetal Bovino (SFB), foram acrescentadas as diferentes concentrações das amostras e submetidas a um tempo de incubação de 24 horas em estufa BOD (Demanda Bioquímica de Oxigênio).

A curva dose-resposta destas substâncias foi realizada através da contagem de células viáveis de *L. chagasi* em hemocitômetro de Neubauer utilizando microscópio óptico na objetiva de 40 X, após as células terem sido diluídas em solução salina estéril. Cada ensaio foi realizado em triplicata. A atividade leishmanicida foi expressa como a concentração efetiva mediana (CE50), ou seja, aquela que causou 50% de morte nos micro-organismos testados, após 24 horas de incubação. Para o cálculo da CE50 foi usado o programa estatístico Origin 5.0.

#### 4.4.1.2.4. Citotoxicidade

Para avaliar o potencial efeito citotóxico dos óleos essenciais e microemulsões foi realizado o ensaio colorimétrico baseado na redução do MTT (Brometo de 3-(4,5-dimetil-tiazol-2-il)-2,5-difenil-tetrazólio). Este método baseia-se na atividade metabólica de células viáveis, formando um produto colorido (cristal de formazan, que é insolúvel em água).

A linhagem celular utilizada foi células de fibroblastos de murinos Swiss albinos (3T3), cultivadas nas placas de 96 poços contendo quantidade padrão de  $5 \times 10^4$  células/mL, em meio de cultura de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) suplementado com 10% de soro fetal bovino, 100 mM L-glutamina, 100 U/mL penicilina e 100 µg/mL penicilina, durante 24 horas a 5% de CO<sub>2</sub>, a 37°C.

Após a incubação, as células foram lavadas com solução tampão fosfato (PBS), em seguida, tratadas com os óleos e microemulsões por 24 h a 37°C. Após o tratamento das células, foram aspirados 100 µL de sobrenadante de cada poço, e então adicionado 10 µL de MTT e incubado por 3 h (MOSMANN, 1983).

Após incubação por 3 horas, os cristais de formazan foram dissolvidos com adição de 100 µL de DMSO. A placa foi submetida a agitação por 10 minutos. A absorção resultante desta reação foi mensurada a 550 nm usando o Bio-Rad 550 (ELISA).

Os poços referentes ao controle negativo foram mantidos nas mesmas condições que os poços submetidos ao tratamento havendo a substituição das amostras por 20 µL de tween (pH 7,2) (MOSMANN, 1983). Como controle positivo foi utilizado o dodecil sulfato de sódio (SDS) nas concentrações de 4,0; 8,0; 16,0; 32,0 e 64 µg/mL.

O percentual de células vivas foi calculado em relação ao controle negativo, representando a viabilidade de cada tratamento, conforme Equação 1 abaixo.

$$\% \text{ células vivas} = \frac{(\text{Absorbância do teste})}{(\text{Absorbância do controle negativo})} \times 100 \text{ ----- Equação 1}$$

#### 4.4.1.2.5. Análise Estatística

A análise estatística deste estudo foi realizada através do teste t-student. Para todos os testes foi considerado o intervalo de confiança de 95%.

### 4.4.1.3. Resultados e Discussão

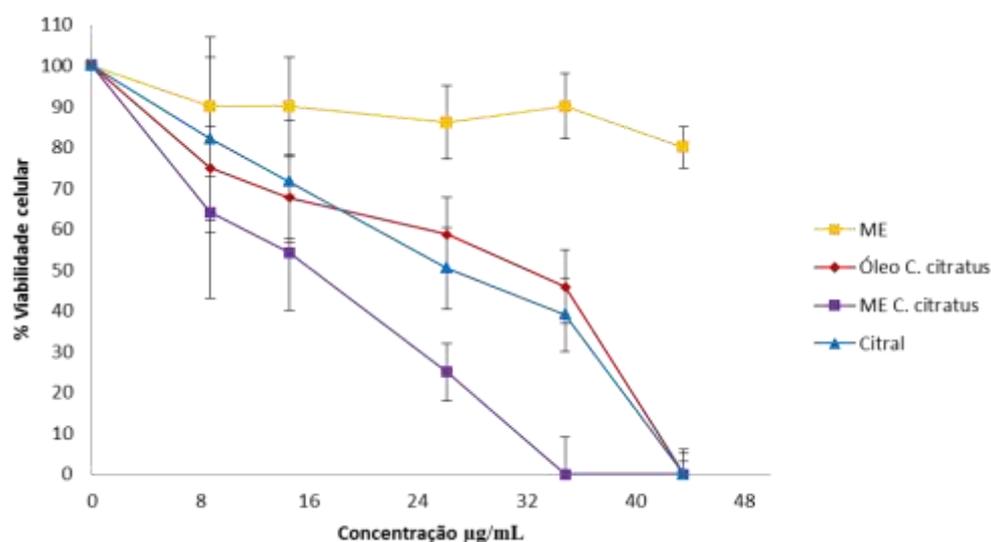
#### 4.4.1.3.1. Atividade Leishmanicida

Os óleos essenciais das espécies de *Cymbopogon* e seus componentes são conhecidos por sua atividade antimicrobiana (PATTNAIK et al., 1995; DE BILLERBECK et al., 2001; NAIK et al., 2010; BASSOLÉA, et al., 2011), anti-helmintica (NIRMAL et al., 2007), antiparasitária (GEORGE et al., 2010), anti-inflamatória (FRANCISCO et al., 2011), anticonvulsivante (FANDOHAN et al., 2008; SILVA et al., 2010), antifúngica (JUGLAL et al., 2002; VELLUTI et al., 2003) e antioxidante (RUBERTO; BARATTA, 2000; HIERRO et al., 2004; KHUNKITTI, 2010).

Estas atividades dos óleos são geralmente atribuídas à presença de compostos fenólicos, alcoólicos e dos constituintes terpenóides (monoterpenos) (Bakalli, 2008).

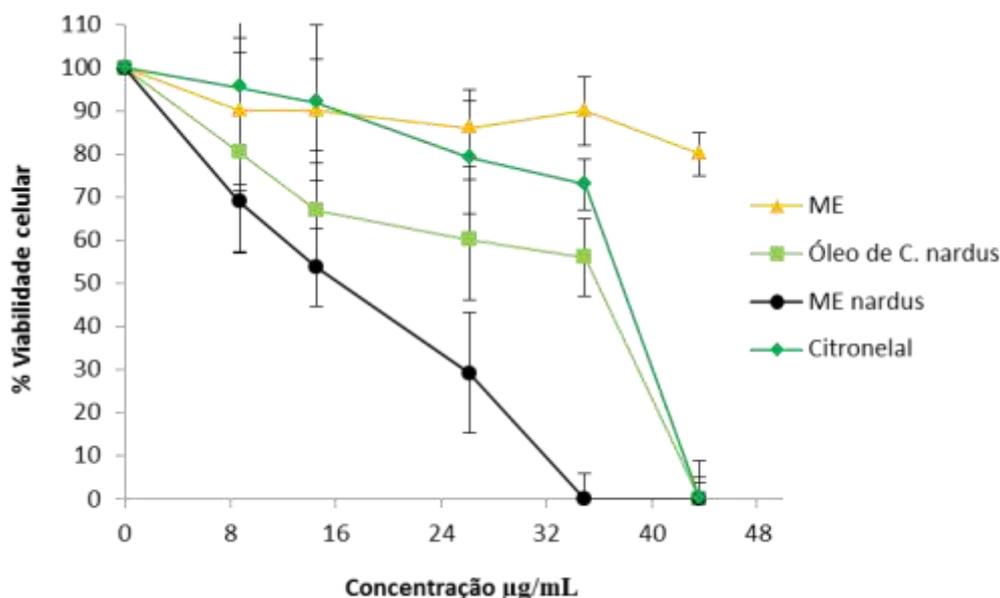
O óleo essencial *C. citratus* apresentou atividade leishmanicida sobre a viabilidade celular da *L. chagasi*, com CE50% de 26,12 µg/mL (24,26-27,97 µg/mL) (Figura 1). Esta atividade também foi comprovada nos estudos de Machado et al. (2012) que demonstraram a atividade leishmanicida de *C. citratus* e do monoterpene citral contra as formas *L. infantum*, *L. major* e *L. tropica*.

**Figura 1** – Percentagem da viabilidade celular da *L. chagasi* frente a concentrações crescentes da ME (microemulsão sem a adição do óleo essencial), do óleo essencial *C. citratus*, da ME-citratus e do citral.



O óleo essencial *C. nardus* apresentou CE50% frente às células *L. chagasi* de 26,28  $\mu\text{g/mL}$  (24,03-28,52  $\mu\text{g/mL}$ ) (Figura 2), comprovando sua atividade leishmanicida, ainda não relatada na literatura.

**Figura 2** – Percentagem da viabilidade celular da *L. chagasi* frente a concentrações crescentes da ME (microemulsão sem a adição do óleo essencial), do óleo essencial *C. nardus*, da ME-nardus e do citronelal.



Os constituintes majoritários dos óleos *C. citratus* e *C. nardus*, o citral e citronelal, respectivamente, foram também testados quanto à atividade na viabilidade celular da *L. chagasi* para que pudéssemos avaliar se a ação dos óleos *C. citratus* e *C. nardus* poderia ser atribuída a estes constituintes (Figuras 1 e 2).

Os resultados obtidos mostraram que o citral, utilizado na mesma concentração encontrado no óleo essencial (67%), apresentou uma CE50% de 26,34  $\mu\text{g/mL}$  (23,97-28,70  $\mu\text{g/mL}$ ). Mostrando ter atividade semelhante ao óleo essencial, o que sugere que a atividade do óleo *C. citratus* deve estar relacionada ao seu constituinte majoritário. Para esta avaliação, foi aplicado o teste t Student, no qual demonstrou que o t calculado para a CE50% foi de 0,115, sendo menor que o t tabelado (2,131), comprovando que não houve diferença significativa entre as médias, com 95% de confiança (Figura 1).

Os resultados obtidos para a avaliação da atividade leishmanicida do citronelal, na concentração de 38%, apresentaram CE50% de 35,47  $\mu\text{g/mL}$  (34,56-36,38  $\mu\text{g/mL}$ ), sugerindo que a atividade do óleo essencial do *C. nardus* deve-se a um sinergismo com

os outros constituintes presentes no óleo. O teste t Student foi aplicado, o qual demonstrou diferença significativa entre as médias, com valor do t calculado (4,40) maior que o t tabelado (2,13), com o nível de significância de 95% (Figura 2).

Geralmente, os componentes principais determinam as propriedades biológicas dos óleos essenciais (BAKKALI, 2008). No entanto, estudos revelam que a atividade biológica destes principais constituintes pode ser modulada por outros constituintes em menor concentração (FRANZIOS et al., 1997; SANTANA-RIOS et al., 2001; HOET et al., 2006).

Os óleos essenciais foram incorporados em sistemas microemulsionados e as formulações obtidas ME-citratu e ME-nardus foram também avaliadas quanto à atividade leishmanicida (Figuras 1 e 2).

Os resultados da atividade leishmanicida demonstraram que em concentrações iguais do óleo essencial de *C. citratus*, a microemulsão apresentou um potencial aumento na atividade leishmanicida, com CE50% de 8,8 µg/mL (4,68-12,93 µg/mL). A comparação estatística pelo teste t Student mostrou que os valores das médias CE50% para o *C. citratus* isolado e a ME-citratu foram diferentes com valor do t calculado (15,98) maior que o t crítico (4,30), com o nível de significância de 95% (Figura 1).

Para a microemulsão de *C. nardus* este aumento na atividade leishmanicida também foi observado com valor de CE50% de 10,93 µg/mL (6,68-14,79 µg/mL). A comparação estatística pelo teste t Student mostrou que os valores das médias CE50% para o *C. nardus* isolado e a ME-nardus foram diferentes com valor do t calculado (4,40) maior que o t crítico (2,13), com o nível de significância de 95% (Figura 2).

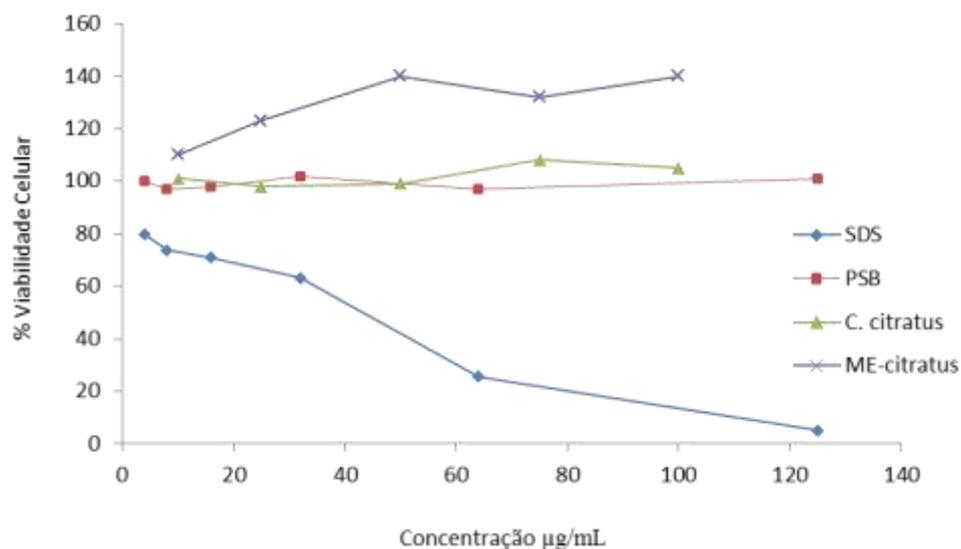
Baldissera et al. (2013) avaliaram o aumento da atividade tripanocida de óleo essenciais de andiroba e aroeira após a incorporação em sistemas microemulsionados.

Chaiyana et al. (2010) observaram aumento da atividade anticolinesterase de microemulsões contendo o óleo essencial de *C. citratus*.

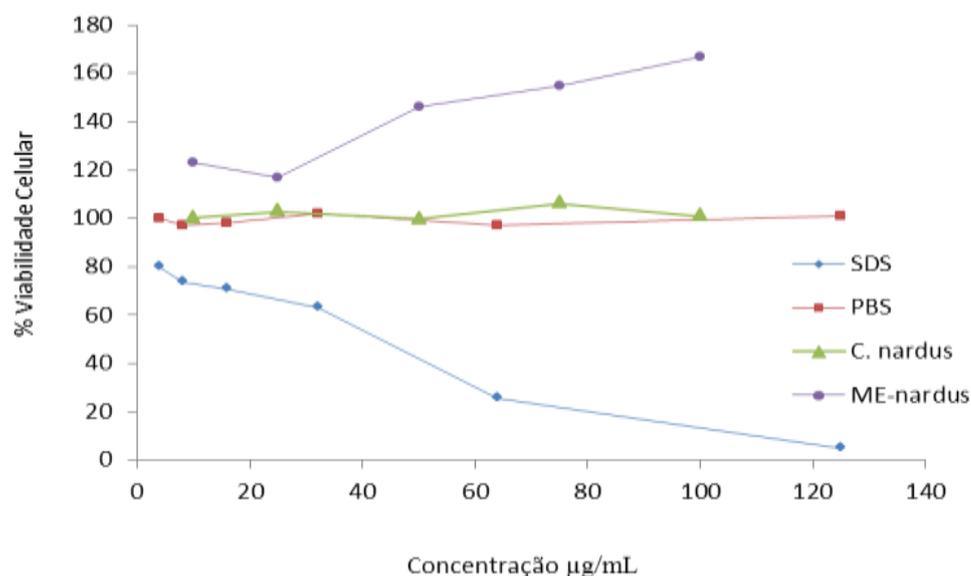
#### **4.4.1.3.2. Citotoxicidade**

A ação de diferentes concentrações dos óleos essenciais *C. citratus* e *C. nardus* e suas microemulsões foram avaliadas com relação a viabilidade celular de fibroblastos 3T3 de murinos utilizando o teste do MTT (Figuras 3 e 4). A atividade mitocondrial foi tomada como uma medida indireta das células viáveis.

**Figura 3** – Toxicidade em diferentes concentrações do óleo essencial *C. citratus* e ME-citratus na viabilidade das células 3T3, comparado ao controle positivo (SDS) e ao negativo (PBS).



**Figura 4** – Toxicidade em diferentes concentrações do óleo essencial *C. nardus* e ME-nardus na viabilidade das células 3T3, comparado ao controle positivo (SDS) e ao negativo (PBS).



A ausência de morte celular revela a não toxicidade das amostras frente às células 3T3. Quando as células foram tratadas com os óleos essenciais apresentaram um aumento na viabilidade celular, sendo este aumento maior para o *C. nardus*. Através dos

dados obtidos para as ME observamos um potencial aumento na viabilidade. Estes dados sugerem uma maior permeabilidade celular para os óleos microemulsionados promovendo uma maior atividade mitocondrial, possivelmente devido a atividade antioxidante.

#### 4.4.1.4. Conclusão

O *C. nardus* apresentou importante atividade leishmanicida, no entanto esses dados não são descritos na literatura. Esta atividade deve-se possivelmente ao sinergismo de todos os constituintes do óleo essencial.

O monoterpeno citral, majoritário no óleo essencial *C. citratus*, apresentou em nosso estudo atividade semelhante ao do óleo essencial, sugerindo ser o responsável por esta atividade biológica.

A atividade leishmanicida para *L. chagasi* dos óleos essenciais foram potencializada quando os óleos foram incorporados em um sistema microemulsionado.

Os resultados de ausência de toxicidade dos óleos essenciais microemulsionados frente as células 3T3 tornaram esse sistema um candidato promissor para o tratamento de leishmaniose.

#### Referências

ARAÚJO C, LEON L. Biological activities of *Curcuma longa* L. *Mem Inst Oswaldo Cruz*; 96:723-8, 2001.

BASSOLÉA, I.H.N., LAMIEN-MEDAB, A., BAYALAA, B., OBAMEA, L.C., ILBOUDOA, A.J., FRANZB, C., NOVAKB, J.; NEBIÉC, R.C., DICKOA, M.H. Chemical composition and antimicrobial activity of *Cymbopogon citratus* and *Cymbopogon giganteus* essential oils alone and in combination *Phytomedicine* 18, 1070– 1074, 2011.

BASSOLÉA, I.H.N., LAMIEN-MEDAB, A.; BAYALAA, B., OBAMEA, L.C., ILBOUDOA, A.J., FRANZ, C.; NOVAK, J.; NEBIÉ, R.C., DICKO, M.H. Chemical composition and antimicrobial activity of *Cymbopogon citratus* and *Cymbopogon giganteus* essential oils alone and in combination. *Phytomedicine* 18, 1070– 1074, 2011.

CHRISTINE N. DUNCANA,B, THOMAS V. RILEY B, KERRY C. CARSONB, CHARLEY A. BUDGEONC, JOANNE SIFFLEETD The effect of an acidic cleanser versus soap on the skin pH and micro-flora of adult patients: A non-randomised two group crossover study in an intensive care unit. *Intensive and Critical Care Nursing* 29, 291—296, 2013.

DAMASCENO, B.P.G.L.; SILVA, J.A.; OLIVEIRA, E.E.; SILVEIRA, W.L.L.; ARAÚJO, I.B.; OLIVEIRA, A.G.4; EGITO, E.S.T. Microemulsão: um promissor carreador para moléculas insolúveis. *Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada*. 32(1):9-18, 2011.

DE BILLERBECK, V.G., ROQUES, C.G., BESSIERE, J.M., FONVIEILLE, J.L., DARGENT, R. Effects of *Cymbopogon nardus* (L.) Watson. Essential oil on the growth and morphogenesis of *Aspergillus niger*. *Canadian Journal of Microbiology* 47, 9–17, 2001.

FONSECA C, SIMÕES S, GASPAR R. Paclitaxel-loaded PLGAc nanoparticles: preparation, physicochemical characterization and in vitro antitumor activity. *J Cont Release*; 83:273-86, 2002.

FRANCISCO, V., FIGUEIRINHA, A., NEVES, B.M., LOPES, M.C., CRUZ, M.T., BATISTA, M.T. *Cymbopogon citratus* as source of new and safe anti-inflammatory drugs: bio-guided assay using lipopolysaccharide-stimulated macrophages. *Journal of Ethnopharmacology* 133, 818–827, 2011.

FRANCISCO, V.; FIGUEIRINHA, A.; NEVES, B.M.; GARCÍA-RODRÍGUEZ, C.; LOPES, M.C.; CRUZ, M.T.; BATISTA, M.T.; *Cymbopogon citratus* as source of new and safe anti-inflammatory drugs: Bio-guided assay using lipopolysaccharide-stimulated macrophages *Journal of Ethnopharmacology* 133, 818–827, 2011.

GEORGE, D.R., SPARAGANO, O.A.E., PORT, G., OKELLO, E., SHIEL, R.S., GUY, J.H. Environmental interactions with the toxicity of plant essential oils to the poultry red GUPTE A, CIFTCI K Formulation and characterization of paclitaxel, 5-FU and paclitaxel + 5-FU micrispheres. *Int J Pharm* 276:93-106, 2004.

HIERRO, I., VALERO, A., PEREZ, P., GONZALES, P., CABO, M.M., MONTILLA, M.P., NAVARRO, .C. Action of different monoterpenic compounds against *Anisakis simplex* S.I.L3 larvae. *Phytomedicine* 11, 2447–2450, 2004.

JUGLAL, S., GOVINDEN, R., ODHAV, B. Spice oils for the control of co-occurring mycotoxin producing fungi. *Journal of Food Protection* 65, 683–687, 2002.

KHUNKITTI, W. In vitro antimicrobial and antioxidant activities of some *Cymbopogon* species. In: Anand, A. (Ed.), *Essential Oil-Bearing Grasses: The genus Cymbopogon*. CRC Press Inc., USA, pp. 167–183, 2010.

LEIMANN F.V.; GONÇALVES, O.H. ; MACHADO, R.A.F.; BOLZAN, A. Antimicrobial activity of microencapsulated lemongrass essential oil and the effect of experimental parameters on microcapsules size and morphology *Materials Science and Engineering C* 29 (2009)

NAIK, M.I., FOMDA, B.A., JAYKUMAR, E., BHAT, J.A. Antibacterial activity of lemongrass (*Cymbopogon citratus*) oil against some selected pathogenic bacterias. *Journal of Tropical Medicine* 3, 535–538, 2010.

NIRMAL, S.A., GIRME, A.S., BHALKE, R.D. Major constituents and antihelmintic activity of volatile oils from leaves and flowers of *Cymbopogon martini* Roxb. *Natural Product Research* 21, 1217–1220, 2007.

OLIVERO-VERBEL, J., NERIO, L.S., STASHENKO, E.E. Bioactivity against *Tribolium castaneum* Herbst (Coleoptera: Tenebrionidae) of *Cymbopogon citratus* and *Eucalyptus citriodora* essential oils grown in Colombia. *Pest Manag. Sci.* 66, 664–668, 2010.

P. FANDOHAN A.; B. GNONLONFIN A.A.; LALEYE C.J.D.; GBENOU, B.R.; DARBOUX C.M.; MOUDACHIROU, B. Toxicity and gastric tolerance of essential oils from *Cymbopogon citratus*, *Ocimum gratissimum* and *Ocimum basilicum* in Wistar rats *Food and Chemical Toxicology* 46, 2493–2497, 2008.

PATNAIK, S., SUBRAMAYAM, V.R., KOLE, C.R., SAHOO, S. Antimicrobial activity of oils from *Cymbopogon* inter and intraspecific differences. *Microbios* 84, 239–245, 1995.

RUBERTO, G., BARATTA, M.T. Antioxidant activity of selected essential oil components in two lipid model systems. *Food Chemistry* 69, 167–174, 2000.

SILVA, R.M., XIMENES, R.M., MARTINS DA COSTA, J.G., KALYNE, L., LEAL, A.M., DE LOPES, A., DE BARROS VIANA, G.S. Comparative anticonvulsant activities of the essential oils (Eos) from *Cymbopogon winterianus* Jowitt and *Cymbopogon citratus* (DC) Stapf. in mice. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology* 381, 415–426, 2010.

SONALI SINHA, DHRUBOJYOTI BISWAS, ANITA MUKHERJEE, Antigenotoxic and antioxidant activities of palmarosa and citronella essential oils *Journal of Ethnopharmacology* 137, 1521–1527, 2011.

SOUMIK BARDHAN A, KAUSHIK KUNDU B, SWAPAN K. SAHA A, BIDYUT K. PAUL B. Physicochemical studies of mixed surfactant microemulsions with isopropyl myristate as oil. *Journal of Colloid and Interface Science* 402 180–189, 2013.

TONNENSEN H, MASSON M, LOFTSSON T. Studies of curcumin and curcuminoids. XXVII. Cyclodextrin complexation: solubility, chemical and photochemical stability. *Int J Pharm* 244:127-35, 2002.

VELLUTI, A., SANCHIS, V., RAMOS, A.J., EGIDO, J., MARIN, S. Inhibitory effect of cinnamon, clove, lemongrass, oregano and palmarose essential oils on growth and fumonisin B1 production by *Fusarium proliferatum* in maize grain. *International Journal of Food Microbiology* 89, 145–154, 2003.

## 5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

---

A caracterização dos lotes do derivado naftoquinônico determinou lotes de qualidades físicas distintas;

A análise térmica, dissolução intrínseca e a cromatografia líquida de alta eficiência são ferramentas importantes na avaliação da reprodutibilidade da tecnologia de síntese de matérias-primas presentes em diferentes produtos farmacêuticos;

Os métodos analíticos para quantificação dos marcadores citral e citronelal nos óleos essenciais e microemulsões foram devidamente desenvolvidos e validados;

O citral e citronelal foram constituintes majoritários dos óleos essenciais *C. citratus* e *C. nardus* estudados;

Os sistemas microemulsionados foram obtidos com sucesso;

As ME's apresentaram cinética de liberação de acordo com o modelo de Higuchi e as membranas PVDF para o citral e PTFE para o citronelal foram as mais adequadas para caracterizar a velocidade e extensão de liberação *in vitro* dos marcadores a partir da matriz estudada;

O estudo demonstrou a atividade leishmanicida inédita do óleo essencial *C. nardus* frente às formas promastigotas da *L. chagasi*;

As microemulsões com óleos essenciais apresentaram atividade leishmanicida e ausência de citotoxicidade para as células 3T3;

O citral apresentou em nosso estudo atividade semelhante ao do óleo essencial, sugerindo ser o responsável por esta atividade biológica

A atividade leishmanicida, para *L. chagasi*, dos óleos essenciais foi potencializada quando os óleos foram incorporados em um sistema microemulsionado.

## REFERÊNCIAS

---

- ALANY, R. G.; RADES, T.; NICOLL, J.; TUCKER, I. G.; DAVIES, N. M. W/O microemulsions for ocular delivery: evaluation of ocular irritation and precorneal retention. *Journal of Controlled Release*, v. 111, n. 1-2, p. 145-152, 2006.
- ALLEN JÚNIOR, L. V.; POPOVICH, N. G. & ANSEL, H. C. *Formas Farmacêuticas E Sistemas De Liberação De Fármacos*. 8. ed. Porto Alegre: Artmed; 2007.
- ALVAR, J.; YACTAYO, S. & BERN, C. Leishmaniasis and poverty. *Trends Parasitol.*, v. 22, n. 12, p. 552-557, 2006.
- AQUINO NETO, F. R. & NUNES, D. S. S. *Cromatografia: princípios básicos de técnicas afins*. Rio de Janeiro: Editora Interciência, 2003.
- AULTON, M. E. *Delineamento de Formas Farmacêuticas*. 2. ed. Porto Alegre: Artmed, p. 504-536, 2005.
- BAILEY, M. S. & LOCKWOOD, D. N. Cutaneous leishmaniasis. *Clin. Dermatol.*, v. 25, n. 2, p. 203-211, 2007.
- BAKKALI, F.; AVERBECK, S.; AVERBECK, D.; IDAOMAR, M. Biological effects of essential oils: a review. *Food Chem. Toxicol.*, v. 46, p. 446-475, 2008.
- BARATTA, M. T.; DORMAN, H. J. D.; DEANS, S. G.; FIGUEIREDO, A. C. Antimicrobial and antioxidante properties of some essential oils. *Flavour Fragrance J.*, v. 13, n. 4, p. 235-244, 1998.
- BARREIRO, E. J. A importância da síntese de fármacos na produção de medicamentos. *Química Nova*, v. 14, n. 3, 1991.
- BASTOS, A. L. A. FMEA como ferramenta de planejamento da qualidade; uma avaliação da aplicação em um processo produtivo de usinagem de engrenagem. Universidade Regional de Blumenau. Blumenau, 2006.
- BEMVINDO, C. S. Estudo Comparativo da Liberação e Penetração Cutânea de Nitrato de Miconazol de Emulsões Tópicas Comerciais. 110 p. Dissertação de Mestrado. Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro. 2006.
- ALANY, R. G.; RADES, T.; NICOLL, J.; TUCKER, I. G.; DAVIES, N. M. W/O microemulsions for ocular delivery: evaluation of ocular irritation and precorneal retention. *Journal of Controlled Release*, v. 111, n. 1-2, p. 145-152, 2006.
- ALLEN JÚNIOR, L. V.; POPOVICH, N. G. & ANSEL, H. C. *Formas Farmacêuticas E Sistemas De Liberação De Fármacos*. 8. ed. Porto Alegre: Artmed; 2007.
- ALVAR, J.; YACTAYO, S. & BERN, C. Leishmaniasis and poverty. *Trends Parasitol.*, v. 22, n. 12, p. 552-557, 2006.

AQUINO NETO, F. R. & NUNES, D. S. S. *Cromatografia: princípios básicos de técnicas afins*. Rio de Janeiro: Editora Interciência, 2003.

AULTON, M. E. *Delineamento de Formas Farmacêuticas*. 2. ed. Porto Alegre: Artmed, p. 504-536, 2005.

BAILEY, M. S. & LOCKWOOD, D. N. Cutaneous leishmaniasis. *Clin. Dermatol.*, v. 25, n. 2, p. 203-211, 2007.

BAKKALI, F.; AVERBECK, S.; AVERBECK, D.; IDAOMAR, M. Biological effects of essential oils: a review. *Food Chem. Toxicol.*, v. 46, p. 446-475, 2008.

BARATTA, M. T.; DORMAN, H. J. D.; DEANS, S. G.; FIGUEIREDO, A. C. Antimicrobial and antioxidante properties of some essential oils. *Flavour Fragrance J.*, v. 13, n. 4, p. 235-244, 1998.

BARREIRO, E. J. A importância da síntese de fármacos na produção de medicamentos. *Química Nova*, v. 14, n. 3, 1991.

BASTOS, A. L. A. FMEA como ferramenta de planejamento da qualidade; uma avaliação da aplicação em um processo produtivo de usinagem de engrenagem. Universidade Regional de Blumenau. Blumenau, 2006.

BEMVINDO, C. S. Estudo Comparativo da Liberação e Penetração Cutânea de Nitrato de Miconazol de Emulsões Tópicas Comerciais. 110 p. Dissertação de Mestrado. Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro. 2006.

BERMAN, B. et al. Topical immunomodulators: tacrolimus and pimecrolimus. In: BOLOGNIA, J.; JORIZZO, J. L.; RAPINI, R. P. editors. *Dermatology*. St. Louis: Mosby, p. 2045-47, 2003.

BEYRER, C.; VILLAR J. C.; SUWANVANICHKIJ, V.; SINGH, S.; BARAL, S. D.; MILLS, E. J. Neglected diseases, civil conflicts, and the right to health. *Lancet*, v. 370, n. 9587, p. 619-27, 2007.

BEZERRA, J. L. *Avaliação da atividade leishmanicida de espécies vegetais*. 64p. Dissertação em Saúde e Ambiente. Universidade Federal do Maranhão, São Luiz, 2006.

BILLERBECK, V. G.; ROQUES, C. G.; BESSIERE, J. M.; FONVIEILLE, J. L.; DARGENT, R. Effects of *Cymbopogon nardus* (L.) Watson. essential oil on the growth and morphogenesis of *Aspergillus niger*. *Canadian Journal of Microbiology*, v. 47, p. 9-17, 2001.

BLUM, J.; DESJEUX, P.; SCHWARTZ, E.; BECK, B.; HATZ, C. Treatment of cutaneous leishmaniasis among travellers. *J. Antimicrob. Chemother.*, v. 53, p. 158-66, 2004.

BRAGA, T. V. Avaliação da atividade farmacológica de *Cissus verticillata* Nicolson & C. E. *Jarvis subsp verticillata* como antioxidante, antifúngico, hipoglicemiante e cicatrizante. 202p. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto, 2008.

BRASIL. *Manual de vigilância e controle da leishmaniose visceral*. Brasília, Ministério da Saúde, 2006.

CASTANO, A. & LECHON, M. J. G. Comparison of basal cytotoxicity data between mammalian and fish cell lines: A literatura survey. *Toxicology In Vitro*, v. 19, p. 695-705, 2005.

CASTRO, L. O. & RAMOS, R. L. D. Principais gramíneas produtoras de óleos essenciais: *Cymbopogon citratus*(DC.) Stapf., capim-cidrô, *Cymbopogon martinii*(Rox.) J. F. Watson, palma-rosa, *Cymbopogon nardus*(L.) Rendle, citronela, *Elyonurus candidus*(Trin.) Hack., capim-limão, *Vetiveria zizanioides*(L.) Nash, vetiver. Porto Alegre: FEPAGRO, p. 23, 2003.

CAVALLI, A.; BOLOGNESI, M. L.; *J. Med. Chem.* v. 52, p. 7339, 2009.

CHABARIBERI, R. A. O.; POZZI, A. C. S.; ZERAIK, M. L.; YARIWAKE, J. H. Determinação espectrométrica dos flavonóides das folhas de Maytenus (Celastraceae) e de Passiflora (Passifloraceae) e comparação com método CLAE-UV. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, v. 19, p. 860-864, 2008.

CHANGEZ, M.; CHANDER, J. & DINDA, A. K. Transdermal permeation of tetracaine hydrochloride by lecitina microemulsion: in vivo. *Colloids and Surface B: biointerfaces*, v. 48, n. 1, p. 58-66, 2006.

CHEN, H.; CHANG, X.; WENG, T.; ZHAO, X.; GAO, Z.; YANG, X. XU, H.; YANG, X. A study of microemulsion systems for transdermal deliveru of triptolide. *Journal of Controlled Release*, v. 98, n. 3, p. 427-436, 2004.

CLAS, S. D.; DALTON, C. R.; HANCOCK, C. B. Differential scanning calorimetry: Applications in drug development. *Pharmaceutical Science and Technology*, v. 2, n. 8, p. 311-320, 1999.

CLOTHIER, R. et al. The FRAME Alternatives Laboratory Database. 1. in vitro basal cytotoxicity determined by the kenacid blue total protein assay. *Alternative to Laboratory Animals*, [S.l.], v. 34, p. 151-175, 2006.

COLLIER, J. W.; SHAH, R. B.; BRYANT, A. R.; HABIB, M. J.; KHAN, M. A.; FAUSTINO, P. J. Development and application of a validated HPLC method for the analysis of dissolution samples of levothyroxine sodium drug products. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, v. 54, p. 433-438, 2011.

COLLINS, C. H.; BRAGA, G. L. & BONATO P. S. *Fundamentos de Cromatografia*. Campinas: Editora Unicamp, 2006.

CONSTANTINIDES, P. P.; YIV, S. H. Particle-Size Determination of Phase-Inverted Water-in-Oil Microemulsions under Different Dilution and Storage-Conditions. *Int J Pharm.*, v. 115, n. 2, p. 225-34, 1995.

CORREA, M. A.; SCARPA, M. V.; FRANZINI, M. C.; OLIVEIRA, A. G. On the incorporation of the non-steroidal anti-inflammatory naproxen into cationic O/W microemulsions. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, v. 43, n. 2, p. 108-114, 2005.

COSTA, A. R. T. Aplicação do ensaio de dissolução na avaliação da qualidade de medicamentos fitoterápicos à base de *Passiflora* sp. Dissertação de Mestrado. Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2008.

COSTA, E. M. BARBOSA-FILHO, J. M.; NASCIMENTO, T. G. do; MACEDO, R. O. Thermal characterization of quercetin and rutin flavonoids, *Thermochimica Acta*, v. 392-393, p. 79-84, 2002.

COSTA, L. C. do B; CORRÊA, R. M.; CARDOSO, J. C. W.; PINTO, J. E. B. P.; BERTOLUCCI, S. K. V.; FERRI, P. H. Secagem e fragmentação da matéria seca no rendimento e composição do óleo essencial de capim-limão. *Horticultura Brasileira*, v. 23, n. 04, p. 956-959, 2005.

CROFT, S. L.; BARRETT, M. P.; URBINA, J. A. Chemotherapy of trypanosomiasis and leishmaniasis. *Trends Parasitol.*, v. 21, n. 11, p. 508-12, 2005.

CROFT, S. L.; SEIFERT, K. & YARDLEY, V. Current scenario of drug development for leishmaniasis. *Indian J Med Res.*, v. 123, n. 3, p. 399-410, 2006.

DALMORA, M. E.; DALMORA, S. L. & OLIVEIRA, A. G. Inclusion complex of piroxicam with  $\alpha$ -cyclodextrin and incorporation in cationic microemulsion. In vitro drug release and in vivo topical anti-inflammatory effect. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 222, n. 1, p. 45-55, 2001.

DAMASCENO, B. P. G. L.; SILVA, J. A.; OLIVEIRA, E. E.; SILVEIRA, W. L. L.; ARAÚJO, I. B.; OLIVEIRA, A. G.; EGITO, E. S. T. Microemulsão: um promissor carreador para moléculas insolúveis. *Rev Ciênc Farm Básica Apl.*, v. 32, n. 1, p. 9-18, 2011.

CONSTANTINIDES, P. P. Lipid microemulsions for improving drug dissolution and oral absorption: physical and biopharmaceutical aspects. *Pharm. Res.*, v. 12, p. 1561-1572, 1995.

DAVID, C. V. & CRAFT, N. Cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis. *Dermatol. Ther.*, v. 22, n. 6, p. 491-502, 2009.

DIAS, L. C.; DESSOY, M. A.; SILVA, J. J. N.; THIEMANN, O. H.; OLIVA, G.; ANDRICOPULO, A. D. Chemotherapy of chagas disease: state of the art and perspectives for the development of new drugs. *Química Nova*, v. 32, n. 9, p. 2444-57, 2009.

DIÓGENES, M. J. N. & COELHO, I. C. B. Leishmaniose visceral americana: manifestações cutâneas. In: Talhari, S.; Neves, R. G. *Dermatologia Tropical*, 2<sup>nd</sup> ed. São Paulo, Brasil: MEDSI, p. 65-72, 1997.

DJORDJEVIC, L.; PRIMORAC, M. & STUPAR, M. In vitro release of diclofenac diethylamine from caprylocaproyl macrogolglycerides bades microemulsions. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 296, n. 1-2, p. 73-79, 2005.

DUTRA, R. C.; BRAGA, F. G.; COIMBRA, E. S.; SILVA, A. D.; BARBOSA, N. R. Atividades antimicrobiana e leishmanicida das sementes de *Pterodon emarginatus* Vogel. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, v. 19, n. 2a, p. 429-435, 2009.

EKWALL, B. The basal cytotoxicity concept. In: GOLDBERG, A. M.; VAN ZUPTHEN, L. F. M. The Word Congress on Alternatives and Anual Use in the Life Sciences: Education, Researches, Testing. Vol. 11. New York: Mary Ann Liebert, p. 721-725, 1995.

ESPOSITO, E.; BORTOLOTTI, F.; MENEGATTI, E., CORTESI, R. Amphiphilic association systems for anphotericin B delivery. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 260, n. 2, p. 249-260, 2003.

FERREIRA, M. E.; ARIAS, R. A.; ORTIZ, S. T.; INCHAUSTI, A.; NAKAYAMA, H. C.; Thouvenel, A. C.; Hocquemiller, R.; Fournet, A. Leishmanicidal activity of two canthin-6-one alkaloids, two major constituents of *Zanthoxylum chiloperone* Var. angustifolium. *J Ethnopharmacol.*,v. 80, n. 2-3, p. 199-202, 2002.

FERREIRA, V. F.; JORQUEIRA, A.; SOUZA, A. M. T.; DA SILVA, M. N.; DE SOUZA, M. C. B. V.; GOUVÊA, R. M.; RODRIGUES, C. R.; PINTO, A. V.; CASTRO, H. C.; SANTOS, D. O.; ARAÚJO, H. P.; BOURGUIGNON, S. C. Trypanocidal agents with low cytotoxicity to mammalian cell line: A comparison of the theoretical and biological features of lapachone derivatives. *Bioorg. Med. Chem.*, v. 14, n. 16, p. 5459, 2006.

FONSECA, C.; SIMÕES, S. & GASPAR, R. Paclitaxel-loaded PLGA nanoparticles: preparation, physicochemical characterization and in vitro antitumor activity. *J. Cont Release*, v. 83, p. 273-86, 2002.

FORMARIZ, T. P.; WANCZINSKI, B. J.; JÚNIOR-SILVA, A. A.; SCARPA, M. V.; OLIVEIRA, A. G. Biotecnologia de sistemas coloidais aplicável na otimização do efeito terapêutico de fármacos usados no tratamento do câncer. *Infarma*, v. 16, n. 1, p.44-57, 2004.

FORMARIZ, T. P; URBAN, M. C. C.; JÚNIOR, A. A. S.; GREMIÃO, M. P. D.; OLIVEIRA, A. G. Microemulsões e fases líquidas cristalinas como sistemas de liberação de fármacos. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*, v. 41, n. 03, p. 301-313, 2005.

FRANÇA, F.; LAGO, E. L. & MARSDEN, P. D. Plants used in the treatment of leishmanial ulcers due to *Leishmania (Viannia) braziliensis* in an endemic area of Bahia, Brazil. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v. 29, p. 229-232, 1996.

FRANCISCO, V.; FIGUEIRINHA, A.; NEVES, B. M.; LOPES, M. C.; CRUZ, M. T.; BATISTA, M.T. *Cymbopogon citratus* as source of new and safe anti-inflammatory drugs: bio-guided assay using lipopolysaccharide-stimulated macrophages. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 133, p. 818-827, 2011.

FREITAS-JUNIOR, L. H.; CHATELAIN. E.; KIM, H. A.; SIQUEIRA-NETO, J. H. Visceral leishmaniasis treatment: What do we have, what do we need and how to deliver it? *International Journal for Parasitology*, v. 2, p. 11-19, 2012.

GENESTRA, M. Proteína quinase A e óxido nítrico sintase como alvos de derivados amidínicos anti-*Leishmania*. 301p. Tese de Doutorado. Fundação Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2003.

GEORGE, D. R.; SPARAGANO, O. A. E.; PORT, G.; OKELLO, E.; SHIEL, R. S.; GUY, J. H. Environmental interactions with the toxicity of plant essential oils to the poultry red mite *Dermanyssus gallinae*. *Medical and Veterinary Entomology*, v. 24, p. 1-8, 2010. Goto H. & Lindoso, J. A. Current diagnosis and treatment of cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis. *Expert Rev Anti Infect Ther.*, v. 8, p. 419-33, 2010.

GIRON, D. & GOLDBRONN, F. Study of the polymorphic behavior of some local anesthetic drugs. *Journal of Thermal Analysis*, v. 49, p. 913-927, 1997.

Grampurohit, N.; Ravikumar, P. & Mallya R. Microemulsions for topical use: a review. *Indian Journal of Pharmaceutical Education and Research*, v. 45, n. 1, p. 100-108, 2009.

GRANADA, A.; NEMEN, D.; DORA, C. L.; NECKEL, G. L.; LEMOS-SENNA, E. O emprego de sistemas de liberação como estratégia para melhorar as propriedades terapêuticas de fármacos de origem natural: o exemplo da camptotecina e seus derivados. *Rev. Ciênc. Farm. Básica Apl.*, v. 28, n. 2, p.129-139, 2007.

GUIDO, R. V. C. & OLIVA, G. Structure-based drug design for tropical diseases. *Curr. Top. Med. Chem.*, v. 9, n. 9, p. 824-43, 2009.

GUIDO, R. V. C.; ANDRICOPULO, A. D. & OLIVA G. Planejamento de fármacos, biotecnologia e química medicinal: aplicações em doenças infecciosas. *Estudos avançados*, v. 24, n. 70, p. 81-98, 2010.

GUPTE, A. & CIFTCI, K. Formulation and characterization of paclitaxel, 5-FU and paclitaxel + 5-FU micrispheres. *Int. J. Pharm.*, v. 276, p. 93-106, 2004.

HADGRAFT, J. & LANE, M. E. Skin permeation: The years of enlightenment. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 305, p. 2-12, 2005.

HAINES, P. J. *Thermal Methods of Analysis: Principles, Application and Problems*, 1<sup>st</sup> ed. London: Chapman & Hall, 1995.

- HAJHASHEMI, V.; GHANNADI, A. & SHARIF, B. Anti-inflammatory and analgesic properties of the leaf extracts and essential oil of *Lavandula angustifolia* Mill. *J. Ethnopharmacol.*, v. 89, p. 67-71, 2003.
- HAJJARAN, H.; MOHEBALI, M.; AKHAVAN, A. A.; TAHERI, A.; BARIKBIN, B.; SOHEILA-NASSIRI, S. Unusual presentation of disseminated cutaneous leishmaniasis due to *Leishmania major*: Case reports of four Iranian patients. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*, v. 6, n. 4, p. 333-336, 2013.
- HALBERSTEIN, R. A. Medicinal Plants: Historical and Cross-cultural Usage Patterns. *Ann. Epidemiol.*, 2005.
- HERNÁNDEZ, F.; MADRID, J.; GARCIA, V.; ORENCO, J.; MEGIAS, M. D. Influence of two plant extracts on broilers performance, digestibility, and digestive organ size. *Poultry Science*, v. 83, p. 169-174, 2004.
- HIERRO, I.; VALERO, A.; PEREZ, P.; GONZALES, P.; CABO, M. M.; MONTILLA, M. P.; NAVARRO, M. C. Action of different monoterpenic compounds against *Anisakis simplex* S.I. L3 larvae. *Phytomedicine*, v. 11, p. 2447-2450, 2004.
- HOTI, E.; CENSI, R.; RICCIUTELLI, M.; MALAJ, L.; BARBONI, L.; MARTELLI, S.; VALLERI, M.; DI MARTINO, P. Validation of an HPLC-MS method for rociverine tablet dissolution analysis. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, v. 47, p. 422-428, 2008.
- KAWAKAMI, K.; YOSHIKAWA, T.; MOROTO, Y.; KANAOKA, E.; TAKAHASHI, K.; NISHIHARA, Y.; MASUDA, K. Microemulsion formulation for enhanced absorption of poorly soluble drugs - I. Prescription design. *J. Controlled Release*, v. 81, n. 1-2, p. 65-74, 2002.
- KHUNKITTI, W. *In vitro* antimicrobial and antioxidant activities of some *Cymbopogon* species. In: ANAND, A. (Ed.), *Essential Oil-Bearing Grasses: The genus Cymbopogon*. CRC Press Inc., USA, p. 167-183, 2010.
- KLEIN, T.; LONGHINI, R.; BRUSCHI, M. L.; MELLO, J. C. P. Fitoterápicos: um mercado promissor. *Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada*. v. 30, n. 3, p. 241-248, 2009.
- KLEIN, T.; LONGHINI, R.; BRUSCHI, M. L.; MELLO, J. C. P. Fitoterápico um mercado promissor. *Rev Ciênc Farm Básica Apl.*, v. 30, n. 3, p. 241-248, 2009.
- KOO, O. M.; RUBINSTEIN, I. & ONYUKSEL, H. Role of nanotechnology in targeted drug delivery and imaging: a concise review. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*, v. 1, p. 193-212, 2005.
- KORDALI, S.; KOTAN, R.; CAKIR, A. Screening of antifungal activities of 21 oxygenated monoterpenes *in vitro* as plant disease control agents. *Allelopathy Journal*, v. 19, n. 2, p. 373-91, 2007.

LAVABRE, M. *Os aromas e perfumes na história*. In: Lavabre, M. *Aromaterapia: a cura pelos óleos essenciais*, 4 ed., Rio de Janeiro: Record, 1997.

LAWRENCE, M. J. & REES, G. D. Microemulsion-based media as novel drug delivery systems. *Advanced Drug Delivery Reviews*, v. 45, p. 89-121, 2000.

LIZARRAGA, E.; ZABALETA, C.; PALOP, J. A. Thermal stability and decomposition of pharmaceutical compounds. *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry*, v. 89, n. 3, p. 783-792, 2007.

LUIZE, P. S.; TIUMAN T. S.; MORELLO, L. G.; MAZA, P. K.; UEDA-NAKAMUR, T.; DIAS FILHO, B. P.; CORTEZ, D. A. G.; MELLO, J. C. P.; NAKAMURA, C. V. Effects of medicinal plant extracts on growth of *Leishmania (L.) amazonensis* and *Trypanosoma cruzi*. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*, v. 41, n. 1, 2005.

LYONS, K. C.; CHARMAN, W. N.; MILLER, R.; PORTER, C. J. H. Factors limiting the oral bioavailability on N-acetylglucosaminyl-N-acetylmuramyl dipeptide (GMDP) and enhancement of absorption in rats by delivery in a water-in-oil microemulsion, *International Journal of Pharmaceutics*, v. 199, n. 1, p. 17-28, 2000.

MACÊDO, R. O. & NASCIMENTO, T. G. Quality control of thiabendazole pre-formulation and tablets by TG and DSC coupled to the photovisual system. *Thermochimica Acta*, v. 392-393, p. 85-92, 2002.

MACHADO, L. D. B.; MATOS, J. R. *Análise térmica – Termogravimetria. Técnicas de Caracterização de Polímeros*. São Paulo: Artliber, p. 209-261, 2004.

MACHADO, M.; SANTORO, G.; SOUSA, M. C.; SALGUEIRO L.; CAVALEIRO C. Activity of essential oils on the growth of *Leishmania infantum* promastigotes. *Flavour Fragr. J.* v. 25, p. 156-160, 2010.

MALTEZOU, H. C. Drug resistance in visceral leishmaniasis. *J. Biomed. Biotechnol.*, DOI: 10.1155/2010/617521, 2010.

MAXIMIANO, F. P. et al. Caracterização físico-química do fármaco antichagásico benznidazol. *Química Nova*, v. 33, n. 8, p. 1714-1719, 2010.

MEYER, V. R. *Practical High-Performance Liquid Chromatography*, 4<sup>a</sup> ed. John Wiley & Sons, 2004.

MISHRA, B. B.; KALE, R. R.; SINGH, R. K.; TIWARI, V. K. Alkaloids: future prospective to combat leishmaniasis. *Fitoterapia*, v. 80, n. 2, p. 81-90, 2009.

MONTANARI, C. A. & BOLZANI, V. S. Planejamento racional de fármacos baseado em produtos naturais. *Quim. Nova*, v. 24, n. 1, p. 105-111, 2001.

MONZOTE, L.; MONTALVO, A. M.; SCULL, R.; MIRANDA, M.; ABREU, J. Combined effect of the essential oil from *Chenopodium ambrosioides* and antileishmanial drugs on promastigotes of *Leishmania amazonensis*. *Rev. Inst. Med. Trop.*, v. 49, n. 4, p. 257-260, 2007.

MORENO, M. A.; BALLESTEROS, M. P. & FRUTOS, P. Lecithin-based oil-in-water microemulsions for parenteral use: pseudoternary phase diagrams, characterization and toxicity studies. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 92, n. 7, p. 1428-1437, 2003.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity. *J. Immunol. Methods*, v. 65, p. 55-63, 1983.

MUMCUOGLU, K. Y.; MAGDASSI S.; MILLER J.; BEN-ISHAI F.; ZENTNER G.; HELBIN V.; FRIGER M.; KAHANA F.; INGBER A.. Repellency of citronella for head lice: double-blind randomized trial of efficacy and safety. *Israel Medical Association Journal*, v. 06, n. 12, p. 756-759, 2004.

NAKKASH-CHMAISSE, H.; MAKKI, R.; NAHHAS, G.; KNIO, K.; NUWAYRI-SALTI, N. Detection of Leishmania parasites in the blood of patients with isolated cutaneous leishmania-sis. *Int. J. Infect. Dis.*, v. 15, p. 491-4, 2011.

NARANG, A. S.; DELMARRE, D. & GAO, D. Stable drug encapsulation in micelles and microemulsions. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 345, n. 1-2, p. 9-5, 2007.

NIRMAL, S. A.; GIRME, A. S. & BHALKE, R. D. Major constituents and antihelmintic activity of volatile oils from leaves and flowers of *Cymbopogon martini* Roxb. *Natural Product Research*, v. 21, p. 1217-1220, 2007.

NWAKA, S. & HUDSON, A. Innovative lead discovery strategies for tropical diseases. *Nat. Rev. Drug Discov.*, v. 5, n. 11, p. 941-55, 2006.

OECD. Test Guideline 428: Skin absorption: in vitro method. Paris, 2004.

OLIVEIRA, A. O.; SCARPA, M. V.; CORREA, M. A.; CERA, L. F. R.; FORMARIZ, T.P. Microemulsões: Estrutura e Aplicações como sistema de liberação de fármacos. *Química Nova*, v. 27, n. 1, p. 131-138, 2004.

ONAWUNMI, G. O.; YISAK, W-AB. & OGUNLANA, E. O. Antibacterial constituents in the essential oil of *Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf. *J. Ethnopharmacol.*, v. 12, n. 3, p. 279-286, 1984.

ORHAN, I.; ASLAN, M.; SENER, B.; KAISEN, M.; TASDEMIR, D. *In vitro* antiprotozoal activity of the lipophilic extracts of different parts of Turkish Pistacia vera L. *Phytomedicine*, v. 13, p. 735-9, 2006.

PATTNAIK, S.; SUBRAMAYAM, V. R.; KOLE, C. R.; SAHOO, S. Antimicrobial activity of oils from *Cymbopogon* inter and intraspecific differences. *Microbios.*, v. 84, p. 239-245, 1995.

PEREIRA, R. J. & CARDOSO, M. G. *J. Biotec. Biodivers.*, v. 3, n. 4, p. 146-152, 2012.

PEREIRA, R. J. & CARDOSO, M. G. Metabólitos secundários vegetais e benefícios antioxidantes. *J. Biotec. Biodivers.*, v. 3, n. 4, p. 146-152, 2012.

PERRY, N. S.; BOLLEN, C.; PERRY, E. K.; BALLARD, C. Salvia for dementia therapy: review of pharmacological activity and pilot tolerability clinical trial. *Pharmacol. Biochem. Behav.*, v. 75, p. 651-659, 2003.

PHAM, T. T. H.; LOISEAU, P. M. & BARRATT, G. Strategies for the design of orally bioavailable antileishmanial treatments. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 454 p. 539-552, 2013.

PINTO, C. N.; DANTAS, A. P.; DE MOURA, K. C. G.; EMERY, F. S.; POLEQUEVITCH, P. F.; PINTO, M. C. F. R.; DE CASTRO, S. L.; PINTO, A. V. *Arzneim. Forsch./Drug Res.*, v.50, p. 1120, 2000.

PISCOPO, T. V. & MALLIA, A. C. Leishmaniasis. *Postgrad Med. J.*, v. 82, n. 972, p. 649-657, 2006.

PLOCK, A.; SOKOLOWSKA-KÖHLER, W. & PRESBER, W. Application of flow cytometry and microscopical methods to characterize the effect of herbal drugs on *Leishmania sp.* *Exp. Parasitol.*, v. 97, p. 141-53, 2001.

QUINTANS-JÚNIOR, L. J.; SOUZA, T. T.; LEITE, B. S.; LESSA, N. M.; BONJARDIM, L. R. SANTOS, M. R.; ALVES, P. B.; BLANK, A. F.; ANTONIOLLI, A. R. Phytochemical screening and anticonvulsant activity of *Cymbopogon winterianus* Jowitt (Poaceae) leaf essential oil in rodents. *Phytomedicine*, v. 15, n. 8, p. 619-24, 2008.

RAMOS-E-SILVA, M.; JACQUES, C. M. C. Leishmaniasis and other Dermatozoonoses in Brazil. *Clinics in Dermatology*, v. 20, p. 122-134, 2002.

RAO, N. R. & NAGARUJU, V. An overview of the recent trends in development of HPLC methods for determination of impurities in drugs. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, v. 33, p. 331-337, 2003.

REICHLING, J.; SCHNITZLER, P.; SUSCHKE, U.; SALLER, R. Essential oils of aromatic plants with antibacterial, antifungal, antiviral and cytotoxic properties-an overview. *Forsch. Komplementmed.*, v. 16, p. 79-90, 2009.

REIS, G. G.; PEISINO, A. L.; ALBERTO, D. L.; MENDES, M. F.; CALÇADA, L. A. Estudo do efeito da secagem em convecção natural e forçada na composição do óleo essencial da citronela (*Cymbopogon nardus*). *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais*, v. 8, n. 4, p. 47-55, 2006.

RIBANI, M.; BOTOLLI, C. B. G.; COLLINS, C. H.; JARDIM, I. C. S. F.; MELO, L. C. F. Validação de métodos cromatográficos e eletroforéticos. *Química Nova*, v. 27, p. 771-780. 2004.

ROCHA, L. G. Avaliação da atividade leishmanicida de naftoquinonas naturais modificadas e desenvolvimento de ensaio biológico para avaliar a potência relativa de 1-azaantraquinonas com atividade leishmanicida. Tese de Doutorado. Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2006.

RODRIGUES, L. F. Avaliação da atividade *in vivo* do antimoniato de meglumina e de sua associação com o tratamento tópico sobre *Leishmania (Viannia) braziliensis* isoladas de pacientes portadores de leishmaniose cutânea. 73p. Dissertação em Ciências da Saúde do Centro de Pesquisas René Rachou, 2012.

ROSSI, C. G. F. T.; DANTAS, T. N. C.; NETO, A. A. D.; MACIEL, M. A. M. Microemulsões: Uma abordagem básica e perspectivas para aplicabilidade industrial. *Revista da Universidade Rural de Seropédica Ciências Exatas e da Terra*, v. 26, n. 1-2, p. 45-66, 2007.

RUBERTO, G. & BARATTA, M. T. 2000. Antioxidant activity of selected essential oil components in two lipid model systems. *Food Chemistry*, v. 69, p. 167-174, 2000.

RUELA, A. L. M.; ARAÚJO, M. B. & PEREIRA, G. R. Desenvolvimento de um teste de dissolução para comprimidos de nimesulida em meio que assegure condições *sink*. *Latin American Journal of Pharmacy*, v. 28, n. 5, p. 661-667, 2009.

RUENRAROENGSACK, P.; COOK, J. M. & FLORENCE, A. T. Nanosystem drug targeting: facing up to complex realities. *Journal of Controlled Release*, v. 141, p. 265-276, 2010.

SANTOS, M. R. A.; LIMA, M. R.; FERREIRA, M. G. R. Uso de plantas medicinais pela população de Ariquemes, em Rondônia. *Horticultura Brasileira*, v. 26, p. 244-250, 2008.

SANTOS, V. L.; SOUZA, M. F. V.; BATISTA, L. M.; SILVA, B. A.; LIMA, M. S.; SOUZA, A. M. F.; BARBOSA, F. C.; CATÃO, R. M. R. Avaliação da atividade antimicrobiana de *Maytenus rigida* Mart. (Celastraceae). *Rev. Bras. Pl. Med.*, v. 13, n. 1, p.68-72, 2011.

SANTOS, D. O.; COUTINHO, C. E.; MADEIRA, M. F.; BOTTINO, C. G.; VIEIRA, R. T.; NASCIMENTO, S. B.; BERNARDINO, A.; BOURGUIGNON, S. C.; CORTE-REAL, S.; PINHO, R. T.; RODRIGUES, C. R.; CASTRO, H. C. Leishmaniasis treatment--a challenge that remains: a review. *Parasitol. Res.*, v. 103, n. 1, p. 1-10, 2008.

SAPORITO, L.; GIAMMANCO, G. M.; DE GRAZIA, S.; COLOMBA, C. Visceral leishmaniasis: host-parasite interactions and clinical presentation in the immunocompetent and in the immunocompromised host. *International Journal of Infectious Diseases*, v.17, p. 572-576, 2013.

SATO, K.; KRIST, S.; BUCHBAUER, G.. Antimicrobial effect of trans-cinnamaldehyde, (-)-perillaldehyde, (-)-citronellal, citral, eugenol and carvacrol on airborne microbes using an airwasher. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, v. 29, n. 11, p.2292-4, 2006.

SIANI, A. C. (Coord.). Desenvolvimento Tecnológico de Fitoterápicos: Plataforma Metodológica. Scriptorio, Rio de Janeiro, 97 p., 2003.

- SIDIBE, L.; CHALCAT, J. C.; GARRY, R. P.; LACOMBE, L.; HARAMA, M. Aromatic plants of Mali (IV): Chemical composition of essential oils of *Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf and *C. giganteus* (Hochst.) Chiov. *J. Essent. Oil Res.*, v. 13, p. 110-2, 2001.
- SILVA, F. C.; FERREIRA, S. B.; KAISER, C. R.; PINTO, A. C.; FERREIRA, V. F. Synthesis of  $\alpha$ - and  $\beta$ -lapachone derivatives from hetero diels-alder trapping of alkyl and aryl o-quinone Methides R.L. *J. Braz. Chem. Soc.*, 2008, 19, 1230-3 *J. Braz. Chem. Soc.*, Vol. 20, No. 8, 1478-1482, 2009
- SILVA, J. A.; APOLINÁRIO, A. C.; SOUZA, M. S. R.; DAMASCENO, B. P. G. L.; MEDEIROS, A. C. D. Administração cutânea de fármacos: desafios e estratégias para o desenvolvimento de formulações transdérmicas. *Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada*, v. 31, n. 3, p.125-134, 2010.
- SILVA, J. A.; SANTANA, D. P.; BEDOR, D. G. C.; BORBA, V. F. C.; LIRA, A. A. M.; EGITO, E. S. T. Estudo de liberação e permeação in vitro do diclofenaco de dietilamônio em microemulsão gel-like. *Quim Nova*, v. 32, n. 6, p. 1389-93, 2009.
- SILVA, J.; ABEBE, W.; SOUSA, S. M.; DUARTE, V. G.; MACHADO, M. I. L.; MATOS, F. J. A. Analgesic and anti-inflammatory effects of essential oils of Eucalyptus. *J. Ethnopharmacol.*, v. 89, p. 277-283, 2003.
- SILVA, M. N.; FERREIRA V. F. & SOUZA, M. C. B. V. Um panorama atual da química e da farmacologia de naftoquinonas, com ênfase na  $\beta$  -lapachona e derivados. *Quim. Nova*, v. 26, n. 3, p. 407-416, 2003.
- SILVA, M. N.; SOUZA, M. C. B. V.; FERREIRA, V. F.; PINTO, A. V. PINTO, M. C. R. F.; WARDELLC, S. M. S. V.; WARDELLD, J. L. Synthesis of new aldehyde derivaties from  $\beta$ -lapachone and nor- $\beta$ -lapachone. *Arkivoc*, p. 156-168, 2003.
- SILVA, R. M.; XIMENES, R. M.; MARTINS DA COSTA, J. G.; KALYNE, L.; LEAL, A. M.; LOPES, A.; BARROS VIANA, G. S. Comparative anticonsvlant activities of the essential oils (Eos) from *Cymbopogon winterianus* Jowitt and *Cymbopogon citratus* (DC) Stapf. in mice. *Archives of Pharmacology*, v. 381, p. 415-426, 2010.
- SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMAN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. Farmacognosia: da planta ao medicamento. 1102p. Florianópolis: Editora da UFSC, 2007.
- SINGH, H. P.; KAUR, S.; NEGI, K.; KUMARI, S.; SAINI, V.; BATISH, D. R.; KOHLI, R. K. Assesmente of in vitro antioxidant activity of essential oil of *Eucalyptus citriodora* (lemon-scented Eucalypt; Myrtaceae) and its major constituents. *Food Science and Technology*, v. 48, p. 237-241, 2012.
- SINGH, N. P. Plant extracts for the control of bacterial growth: Efficacy, stability and safety issues for food application. *International Journal of Food Microbiology*, v. 156, p. 7-17, 2012.

SINGH, N.; KAUR, J.; KUMAR, P.; GUPTA, S.; SINGH, N.; GHOSAL, A.; DUTTA, A.; KUMAR, A.; TRIPATHI, R.; SIDDIQI, M. I.; MANDAL, C.; DUBE, A. An orally effective dihydropyrimidone (DHPM) analogue induces apoptosis-like cell death in clinical isolates of *Leishmania donovani* over expressing pteridine reductase. *Parasitol. Res.*, v. 105, n. 5, p. 1317-1325, 2009.

SINGH, S. & SIVAKUMAR, R. Challenges and new discoveries in the treatment of leishmaniasis. *J. Infect. Chemother.*, v. 10, n. 6, p. 307-315, 2004.

SINTOV, A. C. & SHAPIRO, L. New microemulsion vehicle facilitates percutaneous penetration in vitro and cutaneous drug bioavailability in vivo. *Journal of Controlled Release*, v. 95, n. 2, p. 173-183, 2004.

SMITH E. W. & HAIGH J. M. In vitro diffusion cell design and validation. II. Temperature agitation an membrane affects on betamethasone 17-valerate permeation. *Acta Pharm. Nord.*, v. 4, n. 3, p. 171-178, 1992.

STORPIRTIS, S.; GONÇALVES, J. E.; CHIANN, C.; GAI, M. N. *Ciências Farmacêuticas Biofarmacotécnica*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p. 32-65, 2009.

TAVARES, E. S.; JULIÃO, L. S.; LOPES, D.; BIZZO, H. R.; LAGE, C. L. S.; LEITÃO, S. G. Análise do óleo essencial de folhas de três quimiotipos de *Lippia alba* (Mill.) N. E. Br. (Verbenaceae) cultivados em condições semelhantes. *Rev Bras Farmacogn.* v. 15, p. 1-5, 2005.

TIUMAN, T. S.; SANTOS, A. O.; UEDA-NAKAMURA, T.; FILHO, B. P. D., NAKAMURA, C.V. Recent advances in leishmaniasis treatment. *International Journal of Infectious Diseases*, v. 15, p. 525-532, 2011.

TOLL, R. Penetration profile of microspheres in follicular targeting of terminal hair follicles. *Journal of Investigative Dermatology*, v. 123, p. 168-176, 2004.

TORRES, F. D.; GALLEGO, L. S.; BANETH, G.; RIBEIRO, V. M.; CAVALCANTI, M. P.; OTRANTO, D. Canine leishmaniosis in the Old and New Worlds: unveiled similarities and differences. *Trends in Parasitology*, v. 28, n. 12, p. 531-538, 2012.

TRONGTOKIT, Y.; RONGSRIYAM, Y.; KOMALAMISRA, N.; APIWATHNASORN, C. Comparative repellency of 38 essential oils against mosquito bites. *Phytotherapy Research*, v. 19, n. 04, p. 303-309, 2005.

UEDA-NAKAMURA, T.; MENDONÇA-FILHO, R. R.; MORGADO-DÍAZ, J. A.; MAZA, P.K.; DIAS-FILHO, B. P.; CORTEZ, D. A. G.; ALVIANO, D. S.; ROSA, M. S. S.; LOPES, A. H. C. S.; ALVIANO, C. S.; NAKAMURA, C. V. Antileishmanial activity of Eugenol-rich essential oil from *Ocimum gratissimum*. *Parasitol. Int.*, v. 55, p. 99-105, 2006.

VIANA, G. S. B.; VALE, T. G.; PINHO, R. S. N.; MATOS, F. J. A. Antinociceptive effect of the essential oil from *Cymbopogon citratus* in mice. *J. Ethnopharmacol.*, v. 70, p. 323-7, 2000.

WENDLANDT, W. W. *Thermal Analysis*. 3<sup>rd</sup> ed. New York: Willey, 1986.

WONG, K. K. Y. SIGNAL, F.A.; CAMPION, S. H.; MOTION, R. L. Citronella as an insect repellent in food packaging. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 53, n. 11, p. 4633-4636, 2005.

WHO. Leishmaniasis. Disponível em: [www.who.int/tdr/diseases/leish.info.htm](http://www.who.int/tdr/diseases/leish.info.htm). Acessado em: 27/11/2010.

WHO. Leishmaniasis: Burden of Disease. Disponível em: <http://www.who.int/leishmaniasis/burden/en/> Acessado: 19/01/2012.