

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

***AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIFÚNGICA DE MONOTERPENOS E
DESENVOLVIMENTO DE MÉTODOS ANALÍTICOS E DE FORMA
FARMACÊUTICA TÓPICA***

DIOGO MIRON

Porto Alegre, abril de 2013

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

***AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIFÚNGICA DE MONOTERPENOS E
DESENVOLVIMENTO DE MÉTODOS ANALÍTICOS E DE FORMA
FARMACÊUTICA TÓPICA***

Tese apresentada por **DIOGO MIRON** para
obtenção do TÍTULO DE DOUTOR em Ciências
Farmacêuticas.

Orientador: Prof^a. Dr. Elfrides E. S. Schapoval

Coorientador: Prof. Dr. Paulo Mayorga

Porto Alegre, abril de 2013

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, em nível de Doutorado – Produção e Controle de Qualidade de Produtos Farmacêuticos – da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul e aprovada em 29.04.2013, pela Banca Examinadora constituída por:

Profa. Dra. Terezinha de Jesus Andreoli Pinto

Universidade de São Paulo – USP (São Paulo)

Prof. Dr. Andreas Loureiro Mendez

Universidade Federal do Pampa – UNIPAMPA (Uruguaiana)

Prof. Dr. Helder Ferreira Teixeira

Universidade Federal do Rio Grande do Sul – UFRGS (Porto Alegre).

Catálogo da Publicação

Miron, Diogo dos Santos

AValiação DA ATIVIDADE ANTIFÚNGICA DE MONOTERPENOS
E DESENVOLVIMENTO DE MÉTODOS ANALÍTICOS E DE FORMA
FARMACÊUTICA TÓPICA / Diogo dos Santos Miron. -- 2013.
186 f.

Orientadora: Elfrides Eva Scherman Schapoval.

Coorientador: Paulo Mayorga.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal do Rio
Grande do Sul, Faculdade de Farmácia, Programa de Pós-
Graduação em Ciências Farmacêuticas, Porto Alegre, BR-
RS, 2013.

1. Monoterpenos. 2. Atividade Antifúngica. 3.
Onicomicoses. 4. Permeação. 5. Métodos
Cromatográficos. I. Schapoval, Elfrides Eva
Scherman, orient. II. Mayorga, Paulo, coorient. III.
Título.

AGRADECIMENTOS

À Profa. Dra. Elfrides Schapoval pela orientação, confiança e dedicação. Pelo exemplo pessoal de competência e liderança sem perder o afeto e a preocupação com meu bem estar. Pelos diversos ensinamentos científicos, pessoais e profissionais. Por me incentivar e acreditar em minha capacidade, apesar das adversidades. Como “Mãe Científica” pelo carinho, cuidado e cobrança quando necessária. Sentirei saudades!

Ao Prof. Dr. Paulo Mayorga, grande amigo, pela coorientação e decisiva colaboração no desenvolvimento deste trabalho. Pelos conhecimentos e sonhos compartilhados. Pela visão diferenciada de nossa profissão e do mundo. Pela influencia em minhas decisões acadêmicas, profissionais e políticas. Muito Obrigado!

Aos professores Dra. Cássia Garcia, Dr. Martin Steppe, Dr. Tércio Oppe e, em especial, à Profa. Dra. Nádia Maria Volpato pelo exemplo profissional, cuidado e auxílio. Aos colegas do LCQFar: Alianise, Amanda, Rita, Débora, Letícia, Gustavo, Jaison, Lorena, Márcia, Mariana, Nathalie, Maximiliano, Rúbia e Vítor pela amizade e auxílios prestados. Em especial ao Clésio, Alini e à bolsista Fernanda Batistti pela amizade, dedicação e colaboração na execução deste trabalho. Obrigado por tudo!

À minha esposa Vanessa Weisheimer pelo amor, companheirismo, incentivo e compreensão, extremamente importantes nesse momento. Pelo conforto e carinho nas horas difíceis. Na logística montada e cobrança de metas para que este trabalho fosse finalizado. Pela admiração que sinto, por sua beleza, inteligência profissional e emocional, perseverança e fortaleza. Te Amo!

À minha família, que sempre incentivou meus estudos. Agradeço pela dedicação ao longo dos anos, amor incondicional e por sempre acreditarem em mim. Aos meus pais Danda e Leônidas que sempre estão presentes e interessados no meu bem estar e evolução profissional. Aos meus irmãos Arianne e Lorenzo pelo apoio, amor e amizade. À minha Tia lara pelo apoio e carinho dedicados em toda esta caminhada. Em memória, à minha amada Tia Maria pelos ensinamentos e exemplos de vida. À família de minha esposa, Dona

Ilana, Seu Celso e Clair, Daniela, Vando e Marta, Duda, pelo carinho, atenção, respeito e amizade. À Dona Delíria, Betinha, Tia Nara e Lucinha pelo carinho e dedicação. Amo vocês!

Aos meus amigos que sempre me incentivam e torcem por mim. Ao Germano Bohrer, Marcio Zanoello e Aline Zimmer pela amizade e bons momentos. Àqueles que me prestigiaram na apresentação e tornam minha vida mais bonita, feliz e agradável: Maria José, Cecília Bley, Vanessa Bley, Fabiano, Boni, Jeferson, Benhur, Eduardo Palma, Aline Camargo e Kellen Souza. Obrigado por tudo!

Àqueles colegas e amigos que me dedicaram seu tempo, apoio e trabalho. Ao Leoni Tadeu Jaime, do Frigorífico Frigozatto, pela gentileza e esforço na obtenção dos cascos bovinos. Ao Gelci Ruberto pelo apoio na aquisição de materiais e aprimoramento dos primeiros cortes dos cascos bovinos. Ao Prof. Mariath, Laboratorista Juliana e Doutorando Marcos, do Laboratório de Anatomia Vegetal da UFRGS, pela receptividade e atenção. Ao Prof. Alexandre Fuentefria e seu time – Fernanda Klein, Aline Lana e Bruna Pippi – do Laboratório de Micologia Aplicada da UFRGS, pela dedicação, esforço e bom convívio. À Profa. Simone Gnoatto e sua bolsista-prodígio Bruna Casanova, do Laboratório de Fitoquímica e Síntese – UFRGS, pela oportunidade e viabilização de novos ensaios, pela facilidade de comunicação e disponibilidade. Ao Farmacêutico Rafael Cornélio (vulgo Profeta) pelos ensinamentos relacionados à permeação de fármacos. Sem vocês teria sido infinitamente mais difícil e, também, mais vazio, obrigado!

Ao Programa de Pós-Graduação da Faculdade de Farmácia - UFRGS pela oportunidade de aprimoramento científico e crescimento pessoal. Aos professores do PPGCF pelas disciplinas disponibilizadas e atenção dispensada. Aos funcionários da Faculdade de Farmácia, pelo trabalho, carinho e reconhecimento. Grato eternamente!

À Banca Examinadora, Profa. Terezinha Pinto, Andreas Mendez e Helder Teixeira, pela disponibilidade, contribuições e discussões que engrandeceram este trabalho. Obrigado!

A todos aqueles, que de uma maneira ou outra, contribuíram para o desenvolvimento deste trabalho.

APRESENTAÇÃO

Este trabalho foi realizado no Laboratório de Controle de Qualidade Farmacêutico (LCQFar) da Faculdade de Farmácia da UFRGS.

Em concordância com as normas vigentes no Regimento do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, esta tese foi redigida na forma de capítulos, com encarte de publicações. Assim, este exemplar encontra-se dividido da seguinte forma:

- ✓ Introdução;
- ✓ Objetivo geral e objetivos específicos;
- ✓ Revisão bibliográfica;
- ✓ Capítulo I – Determinação dos isômeros do citral por PLS-UV;
- ✓ Capítulo II – Avaliação da atividade e mecanismo de ação dos monoterpenos contra dermatófitos e leveduras;
- ✓ Capítulo III – Validação de método analítico e estabilidade dos isômeros do citral;
- ✓ Capítulo IV – Desenvolvimento de método por HPLC-DAD para quantificação de antifúngicos em estudo de permeação;
- ✓ Capítulo V – Estudo de permeação;
- ✓ Considerações Finais;
- ✓ Referências;
- ✓ Anexos.

Sumário

1	INTRODUÇÃO.....	1
2	OBJETIVOS.....	7
2.1	Objetivo geral	9
2.2	Objetivos específicos	9
3	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	11
3.1	Óleos Voláteis	13
3.2	Propriedades Químicas, Físicas e Físico-Químicas do Citral	13
3.3	Propriedades Antimicrobianas do Citral	16
3.4	Mecanismo de Ação.....	20
3.5	Estabilidade.....	24
3.6	Caracterização e Propriedades da Unha	27
3.7	Infecções Fúngicas na Unha.....	29
3.8	Caracterização da Queratina	31
3.9	Cascos Bovinos como Modelo de Permeação para Unha Humana....	32
3.10	Formulações para Unhas.....	34
3.11	Cálculos para Obtenção do Fluxo e Coeficiente de Permeabilidade	37
4	CAPÍTULO I – DETERMINAÇÃO DOS ISÔMEROS DO CITRAL POR PLS-UV	39
4.1	Introdução	41
4.2	Artigo.....	41
5	CAPÍTULO II – AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE E MECANISMO DE AÇÃO DOS MONOTERPENOS CONTRA DERMATÓFITOS E LEVEDURAS	61
5.1	Introdução	63
5.2	Avaliação da Atividade Antifúngica de Complexos de Citral com Ciclodextrinas	64
5.3	Artigo.....	66

6	CAPÍTULO III – VALIDAÇÃO DE MÉTODO ANALÍTICO E ESTABILIDADE DOS ISÔMEROS DO CITRAL	81
6.1	Introdução	83
6.2	Materiais e Métodos.....	84
6.3	Resultados e Discussão.....	90
6.4	Conclusão	98
7	CAPÍTULO IV - DESENVOLVIMENTO DE MÉTODO POR HPLC-DAD PARA QUANTIFICAÇÃO DE ANTIFÚNGICOS EM ESTUDO DE PERMEAÇÃO	99
7.1	Introdução	101
7.2	Artigo.....	101
8	CAPÍTULO V - ESTUDO DE PERMEAÇÃO.....	119
8.1	Introdução	121
8.2	Resultados Preliminares	121
8.3	Artigo.....	122
9	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	143
10	REFERÊNCIAS	149
11	ANEXO	163

Lista de Figuras

Figura 3.1. Estrutura química dos isômeros do Citral (Geranial e Neral)	13
Figura 3.2. Estruturas químicas do Geraniol e Nerol.....	15
Figura 3.3. Alvos para ação de antifúngicos.....	20
Figura 3.4. Representação esquemática do mecanismo de ação das equinocandinas.	21
Figura 3.5. Representação esquemática do mecanismo de ação da anfotericina B.	22
Figura 3.6. Ilustração dos poros formados pela anfotericina na membrana de fungos.	23
Figura 3.7. Microscopia Eletrônica por Tansmissão de <i>T. menthagrophytes</i> exposto ao citral.	24
Figura 3.8. a) Reatividade de grupamentos carbonila; b) distribuição eletrônica em composto com liga dupla conjugada.	24
Figura 3.9. Degradação do citral em função do pH.	25
Figura 3.10. Oxidação do citral e formação dos isômeros ácido gerânico e ácido nérico.	26
Figura 3.11. Produtos de oxidação do citral em nanoemulsões.	26
Figura 3.12. a) Anatomia da unha; b) onicomicose subungueal distal; c) onicomicose superficial branca; d) onicomise distrófica total.	31
Figure 4.1. Chemical structures of citral isomers – neral and geranial.	43
Figure 4.2. (a) Chromatogram of the solution of citral (1.5 mg mL ⁻¹). (b) Chromatogram of neral and geranial purified.	50
Figure 4.3. (a) UV spectra of neral (8.8 µg.mL ⁻¹) and geranial (7.9 µg.ml ⁻¹) with 60% acetonitrile as diluent. (b) First derivative UV spectra of neral and geranial.	51
Figure 4.4. RSEP values of the full factorial design for (a) neral and (b) geranial.	53

Figure 4.5. Overlaid contour plot of RSEP (%) for neral and geranial obtained in the CCD-RSM analysis.	54
Figure 4.6. Plot of PRESS against the number of components. (a) neral and (b) geranial.	55
Figure 5.1. MIC Box plot of monoterpenes and antifungals against (a) yeast and (b) dermatophytes. Substances were compared using the Friedman test (nonparametric test for paired/matched data and Dunn's post test to compare all substances). When the substance showed MIC > 128 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, MIC = 256 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ was used for statistical purposes.	72
FIGURE 5.2. Synergism evaluation among CIT isomers. FICI ≤ 0.5 indicates synergism.	74
Figure 5.3. Optical microscopy of <i>T. assahii</i> after 7 days of incubation in culture medium (a) no antifungal, (b) medium with AFG and sorbitol.....	76
Figure 5.4. Effect of exogen ergosterol (50–250 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) on the MIC of monoterpenes (CIT, GOL and NOL) and amphotericin B (AMP) against <i>T. assahii</i> TAH10.....	77
Figura 6.1. Isômeros do citral e a rotação de 180° em torno da liga dupla.	84
Figura 6.2. Cromatogramas em 240 nm do creme base (a) e do creme contendo citral (b) com avaliação das purezas dos picos do neral e geranial..	90
Figura 6.3. Efeito dos fatores avaliados no teste de robustez na quantificação dos isômeros do citral.	91
Figura 6.4. Efeitos dos fatores nos parâmetros cromatográficos.	92
Figura 6.5. Estabilidade do geranial em diferentes pH. Cada ponto é média de três determinações.....	94
Figura 6.6. Estabilidade do neral em diferentes pH. Cada ponto é média de três determinações.....	95
Figura 6.7. Cromatograma em 240 nm de solução de neral em pH 4,0 no (a) tempo zero e (b) após 30 dias de acondicionamento a 18 °C.....	95
Figura 6.8. Estabilidade do geranial e neral em diferentes temperaturas. Cada ponto é média de três determinações.	96

Figura 6.9. Estabilidade dos isômeros do citral em diferentes solventes e no creme, mantidos a temperatura de 6 °C. Cada ponto é média de duas determinações.....	97
Figura 6.10. Cromatograma em 240 nm do citral no tempo zero e após 60 dias de acondicionamento a 6 °C, nas diferentes soluções e no creme de citral. a) Etanol 95%; b) Etanol 70%; c) Acetona; d) Creme.....	97
Figura 7.1. Cromatograma obtido por HPLC-DAD para análise do Citral, Nerol e geraniol.	102
Figure 7.2. Chromatograms, library search and spectrum of: a) GOL; b) NAL and GAL; c) FLU; d) MCZ; e) TBF; f) BTF.....	109
Figure 7.3. Cumulative amount of drug permeated through bovine hoof membranes versus time. Each point is the mean of four determinations.	117
Figura 8.1. Fotografias das células de difusão e visualização da coloração das membranas após 48 h. Todas as imagens são em formulações gel, exceto por (b) que é esmalte. a) citral; b) citral – esmalte; c) geraniol; d) fluconazol; e) miconazol; f) terbinafina; g) butenafina.	122
Figure 8.2. Permeability coefficient of GOL (mean + sd, n =4) for formulations with different penetration enhancers through bovine hoof membranes. Statistical analysis was performed comparing the control against the other using Dunnett's post-test.....	129
Figure 8.3. Box Plot of GOL Lag time for formulations with different penetration enhancers through bovine hoof membranes (n = 4).....	131
Figure 8.4. Relationship between the permeability coefficient (<i>P</i>) and de molecular weight (MW) for a series of antifungal drugs. Each value represents the mean of four determinations. The dotted line represents the 95% confidence interval of the regression line.....	132
Figure 8.5. Cumulative amount of drug permeated per crosssectional area through bovine hoof membranes versus time. Each point is the mean of four determinations.....	135

Figure 8.6. MIC and Efficacy Index prediction of antifungals against dermatophytes. MIC results are represented as geometric mean. a) *T. rubrum* (n = 5); b) *T. mentagrophytes* (n = 3); c) *M. canis* (n = 4)..... 137

Lista de Tabelas

Tabela 3.1. Propriedades químicas, físicas e físico-químicas do citral, geranial e neral.	14
Tabela 3.2. Propriedades químicas, físicas e físico-químicas do geraniol e nerol.	15
Tabela 3.3. Atividade antimicrobiana de diferentes óleos voláteis contra diferentes espécies de microrganismos.	17
Table 4.1. Concentration of citral isomers in different mixtures of the standard calibration.	47
Table 4.2. Factors and levels of factorial experimental design.	48
Table 4.3. Operating conditions to prepare citral-cyclodextrins complexes using a Mini Spray Drier equipment.	49
Table 4.4. Summary of multivariate calibration for neral and geranial obtained by PLS-UV method.	55
Table 4.5. Recovery of neral and geranial in seven samples using the PLS-UV calibration model optimized by CCD-RSM.	56
Table 4.6. Percentage of neral and geranial in the complexes of citral with cyclodextrins determined from the multivariate calibration obtained by PLS-UV method.	57
Tabela 5.1. Suscetibilidade de fungos aos complexos de citral-ciclodextrinas, óleos voláteis e antifúngicos.	65
Table 5.2. Susceptibility of Yeast and Dermatophytes against monoterpenes and antifungal drugs. Median MIC in $\mu\text{g.mL}^{-1}$ (the results in brackets represent the maximum and minimum MIC for each specie).	73
Table 5.2. MIC values ($\mu\text{g.mL}^{-1}$) of monoterpenes and anidulafungin against <i>T. assahii</i> TAH10 in the Sorbitol Protection Assay.	75
Tabela 6.1. Condições cromatográficas utilizadas na validação de método por LC-UV para determinação de citral em solução e em cremes.	85
Tabela 6.2. Fatores e níveis empregados no teste de robustez.	87

Tabela 6.3. Desenho factorial fracionado de Plackett-Burman.....	87
Tabela 6.4. Substâncias empregadas na preparação do creme base.	89
Tabela 6.5. Resumo dos resultados da Linearidade, precisão e exatidão.	91
Tabela 6.6. Relação dos resultados extremos encontrados para os parâmetros cromatográficos no teste de robustez e os limites de aceitação estabelecidos experimentalmente.....	93
Table 7.1. Chromatographic conditions.....	105
Table 7.2. Variations in chromatographic conditions for the robustness test..	106
Table 7.3. Summary of analytical parameters for the seven antifungals analyzed by HPLC-DAD.	111
Table 7.4. Chromatographic parameters and robustness result for the seven antifungals analyzed by HPLC-DAD.....	115
Table 8.1. Content of pharmaceutical adjuvants in formulations containing GOL 2%.....	126
Table 8.2. Chromatographic conditions.....	128
Table 8.3. Molecular weights (MW), Lag Time and Flux (J) of antifungals in gel formulation containing AC 5% through bovine hoof membranes ($h = 200 \mu\text{m}$, $A = 2.5 \text{ cm}^2$).....	134
Table 8.4. Values for permeability and flux through the nail plate estimated from the equations of Kobayashi <i>et al.</i>	136

RESUMO

Os monoterpenos são em sua maioria óleos e possuem diferentes usos como aromatizantes, antioxidantes, antimicrobianos, etc. O citral e seus isômeros (neral e geranial), geraniol e nerol são exemplos de monoterpenos. Estes possuem estrutura e propriedades químicas similares. O objetivo deste trabalho foi avaliar a atividade antifúngica destas substâncias e caracterizar suas permeações através de membranas de cascos bovinos que simulam a unha humana. A análise da atividade antifúngica foi realizada empregando método de referência para microdiluição e foram avaliados dermatófitos (4 espécies) e leveduras (7 espécies). Os monoterpenos se apresentaram mais ativos contra as espécies de dermatófitos. O mecanismo de ação foi avaliado e verificou-se afinidade pelo ergosterol indicando que a ação destes monoterpenos deve-se a sua ação na membrana celular do fungo. Métodos por HPLC com detecção no UV foram desenvolvidos para quantificação dos monoterpenos nos estudos de permeação e avaliação da estabilidade em diferentes veículos. O estudo de permeação por membranas de cascos bovinos foi útil para otimização de formulação e melhor entendimento de como a unha humana funciona como barreira a fármacos. O geraniol, entre os antifúngicos avaliados, foi o que apresentou maior permeação.

Palavras-chave: citral, neral, geranial, nerol, geraniol, atividade antifúngica, cromatografia líquida, permeação, anfotericina B, anidulafungina, fluconazol, miconazol, terbinafina, butenafina.

ABSTRACT

The monoterpenes are mostly oils and have different uses such as flavorants, antioxidants, antimicrobial agents, etc. Citral and its isomers (neral and geranial), geraniol and nerol are examples of monoterpenes. These possess similar chemical structure and properties. The goal of this study was to determine the antifungal activity of these substances and evaluate its permeation through membranes of bovine hooves that simulate the human nail. Analysis of antifungal activity was performed using microdilution reference method against dermatophyte (4 species) and yeasts (7 species). The monoterpenes were more active against dermatophyte species. The mechanism of action was evaluated and the monoterpenes showed great affinity for ergosterol indicating that its action is related to destabilization of the cell membrane of the fungi. Methods by HPLC with UV detection were developed for quantifying the monoterpenes in the permeation studies and evaluation of their stability in different vehicles. The permeation study through membrane of bovine hoof was usefull for formulation optimization and better understanding of how the human nail acts as a barrier to drugs. The geraniol, among four other antifungal agents tested, showed the largest permeation.

Keywords: citral, neral, geranial, nerol, geraniol, antifungal activity, liquid chromatography, permeation, amphotericin B, anidulafungin, fluconazole, miconazole, terbinafine, butenafine.

1 INTRODUÇÃO

Os monoterpenos são óleos voláteis que contêm 10 carbonos, são comumente líquidos e aromáticos. O citral (mistura dos isômeros geométricos neral e geranial), geraniol e nerol são exemplos de monoterpenos que possuem atividade antimicrobiana (KHAN AND AHMAD, 2011; ZORE *et al.*, 2011; AIEMSAARD *et al.*, 2011; NGAN *et al.* 2012). Estes monoterpenos são comercialmente importantes e podem ser empregados na preparação de perfumes e aromatização de alimentos. Na Indústria Farmacêutica são utilizados na produção de vitamina A, iononas, metiliononas e mentol (TRASARTI *et al.*, 2004; MAKI-ARVELA *et al.*, 2005; PIHLASATO *et al.*, 2007).

O citral é um aldeído α,β -insaturado com uma liga dupla isolada adicional. Os aldeídos são suscetíveis a reações químicas em condições de armazenagem e, especialmente, em água. O citral possui uma liga dupla conjugada ao grupamento carbonila que reduz sua reatividade. Porém, o uso do citral em formulações continua um desafio devido a sua instabilidade química (SYKES, 1969; DJORDJEVIC *et al.*, 2008; MEI *et al.*, 2010; CHOI *et al.* 2009; YANG, *et al.* 2012).

As onicomicoses são infecções fúngicas das unhas dos dedos das mãos e pés, sendo que os principais microrganismos causadores de onicopatias são dermatófitos e leveduras (EINARSON *et al.*, 1996, REPKA *et al.*, 2004). Por sua vez, os dermatófitos são os microrganismos que causam infecções em tecidos queratinizados (por exemplo, pele, cabelos e unhas). Estes microrganismos pertencem aos gêneros: *Tricophyton*, *Epidermophyton* e *Microsporum*.

As unhas humanas recobrem e protegem a parte dorsal terminal dos dedos das mãos e pés; são formadas, basicamente, por células queratinizadas conectadas fortemente por numerosas ligações intercelulares, grânulos de revestimento de membrana e desmossomos (MURDAN, 2002; NOGUEIRAS-NIETO *etal.*, 2011). A quantidade de enxofre é de, aproximadamente, 10%, principalmente presente na forma de ligações dissulfeto que interligam as fibras da queratina e concedem resistência à unha (WALTERS *et al.*, 2012).

Estudos de permeação de fármacos são realizados com modelo *in vitro* empregando cascos bovinos finamente fatiados de maneira a simular o efeito de barreira da unha humana (MERTIN, LIPPOLD, 1997a; KHENGAR *et al.*,

2007; LUSIANA *et al.*, 2011; NOGUEIRAS-NIETO *et al.*, 2013). As principais vantagens do modelo com cascos bovinos são: a facilidade de obtenção e as maiores dimensões das membranas fatiadas que facilmente se adaptam às células de difusão convencionais (MONTI *et al.*, 2011).

Métodos analíticos precisos, exatos e robustos são fundamentais para a correta interpretação dos resultados de estudos de permeação e estabilidade. Os monoterpenos são rotineiramente analisados empregando a técnica de cromatografia gasosa associada a detectores de massas ou ionização por chama (BRASIL, 2010; BASSOLÉ *et al.*, 2011; OMAR *et al.*, 2011). Contudo, métodos por cromatografia líquida com detecção por massas ou UV tem ganhado espaço na análise dos monoterpenos (RAUBER *et al.*, 2005; VILLA *et al.*, 2007; WEISHEIMER *et al.*, 2010; TUREK, STINTZING, 2011).

A análise estatística dos resultados das determinações quantitativas de fármacos em diferentes amostras é essencial para o melhor entendimento, ajuste e confiabilidade dos métodos analíticos. Diferentes testes e parâmetros estatísticos são utilizados na interpretação dos resultados analíticos e o estabelecimento de limites de aceitação é fundamental durante o emprego do método analítico na rotina (ERMER, 2001). Da mesma forma, a caracterização dos parâmetros cromatográficos relacionados à pureza de pico, separação, afinidade e eficiência da coluna são essências para reprodutibilidade dos métodos (SNYDER *et al.*, 2010).

Formulações tópicas e orais continuam sendo a terapia de escolha para o tratamento de infecções fúngicas. Porém, o regime oral pode levar meses para tornar-se efetivo, pois requer grandes quantidades de fármaco na circulação para se ter concentração terapêutica local, como, por exemplo, na pele, cabelos e unhas. Além disso, a terapia sistêmica pode ser contraindicada e possui efeitos adversos potenciais conhecidos (REPKA *et al.*, 2004).

O sucesso de uma terapia tópica contra onicomicoses é dependente da escolha apropriada do antifúngico e da formulação que maximize a difusão do fármaco através da unha até obter-se concentrações que excedam a concentração inibitória mínima do agente infeccioso (MARTY, 1995). O reduzido número de substâncias e suas apresentações farmacêuticas para uso

tópico demonstram a necessidade e o desafio de se obter medicamentos antifúngicos de ação local (GRIFFITH, TRACY, 2002).

Neste contexto, a seguir encontram-se estudos que visam caracterizar a atividade antifúngica do citral e seus isômeros, do geraniol e do nerol. Formulações foram testadas em busca daquela que garanta a melhor permeação dos monoterpenos. Além disso, diferentes métodos analíticos foram desenvolvidos para determinação dos monoterpenos e de antifúngicos das classes alilaminas e azóis.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

- Avaliar a atividade antifúngica dos monoterpenos (citral e seus isômeros, geraniol e nerol), desenvolver formulação tópica contendo monoterpenos e avaliar sua permeação através de membranas obtidas de cascos bovinos.

2.2 Objetivos específicos

- Desenvolver método para purificação do neral e geraniol a partir do citral;
- Preparar complexos do citral com ciclodextrinas e desenvolver método quantitativo para avaliação dos isômeros;
- Avaliar a atividade antifúngica dos isômeros purificados do citral, do geraniol e nerol;
- Investigar o mecanismo de ação do citral, do geraniol e do nerol;
- Desenvolver método e avaliar a estabilidade do citral e seus isômeros em diferentes meios/veículos;
- Desenvolver método analítico por HPLC-DAD para análise dos isômeros do citral, geraniol, nerol, fluconazol, miconazol, terbinafina e butenafina;
- Avaliar a influência de diferentes promotores na permeação do geraniol através de membranas obtidas a partir de cascos bovinos;
- Preparar formulação com diferentes antifúngicos e comparar a influência do peso molecular na permeação através de membrana de cascos bovinos.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Óleos Voláteis

Os monoterpenos são uma classe dos terpenos e muitos destes podem ser também considerados óleos voláteis. Os monoterpenos são formados basicamente por duas unidades de isopreno e possuem a característica de possuírem 10 carbonos. Podem ser lineares ou conter anéis. O citral e seus isômeros, o geraniol e nerol são considerados monoterpenos (SIMÕES, SPITZER, 2004).

Os óleos voláteis possuem grande importância econômica sendo amplamente utilizados na Indústria alimentícia (principalmente como aromatizante de alimentos), cosmética (uso como essência em produtos cosméticos, especialmente perfumes) e farmacêutica (para prevenir e tratar doenças e como precursores de antioxidantes e vitaminas) (SIMÕES, SPITZER, 2004; EDRIS, 2007).

3.2 Propriedades Químicas, Físicas e Físico-Químicas do Citral

O citral é uma mistura de dois isômeros geométricos – neral (cis) e geraniol (trans) (Figura 3.1) e, comercialmente, as proporções dos isômeros são praticamente iguais, em torno de 50% para cada isômero. A Tabela 3.1 apresenta as propriedades do citral, geraniol e neral.

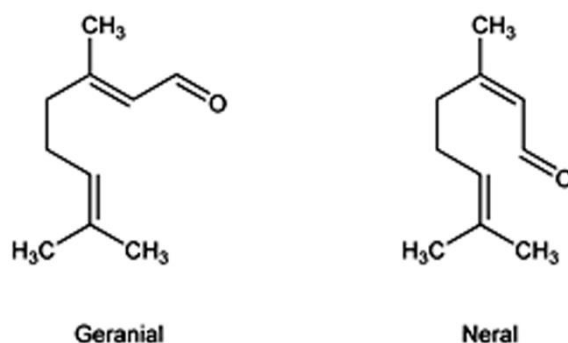


Figura 3.1. Estrutura química dos isômeros do Citral (Geraniol e Neral)

Tabela 3.1. Propriedades químicas, físicas e físico-químicas do citral, geranial e neral.

Propriedades	Citral	Geranial	Neral
Nome Químico	3,7-Dimetil-2,6-octadienal	(E)-3,7-Dimetil-2,6-octadienal	(Z)-3,7-Dimetil-2,6-octadienal
Fórmula / MM	C ₁₀ H ₁₆ O / 152,23 g/mol		
Registro CAS	5392-40-5	141-27-5	106-26-3
Outros Nomes	---	Trans-citral; citral a	Cis-citral; citral b
Características Organolépticas	Líquido levemente amarelado com odor característico de limão.	Líquido oleoso com intenso odor de limão.	Líquido oleoso com odor de limão menos intenso que o geranial.
Coeficiente de Partição (Log P)	---	3,0	2,8
Densidade (d_4^{20})	---	0,8888 g/mL	0,8860 g/mL
Índice de Refração (n_D^{20})	1,4860-1,4900	1,4898	1,4869
Solubilidade	Praticamente insolúvel em água (590 mg/L a 25 °C). Miscível com álcool, éter, benzoato de benzila, dietilftalato, glicerol, propilenoglicol, óleo mineral, óleos essências.		
Uso	Na síntese de vitamina A, ionona, metilionona. Como flavorizante e na perfumaria por seu efeito cítrico.		

MM – Massa Molecular; CAS – Chemical Abstract Service; P = octanol / água a 25 °C.

Fonte: (The Merck, 2008; NIST, 2011; OECD SIDS, 2011).

Além do uso do citral e de seus isômeros, neste trabalho também foram empregados, os monoterpenos e isômeros geraniol e nerol (Figura 3.2). As propriedades destes estereoisômeros estão apresentadas na Tabela 3.2.

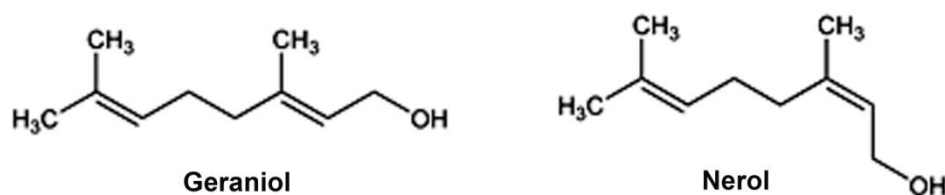


Figura 3.2. Estruturas químicas do Geraniol e Nerol.

Tabela 3.2. Propriedades químicas, físicas e físico-químicas do geraniol e nerol.

Propriedades	Geraniol	Nerol
Nome Químico	(E)-3,7-Dimetil-2,6-octadien-1-ol	(Z)-3,7-Dimetil-2,6-octadien-1-ol
Fórmula / MM	C ₁₀ H ₁₈ O / 154,25 g/mol	
Registro CAS	106-24-1	106-25-2
Outros Nomes	Trans-3,7-dimethyl-2,6-octadien-8-ol; lemonol	cis-2,6-dimethyl-2,6-octadien-8-ol
Características Organolépticas	Líquido oleoso com odor adocicado de rosas	Líquido oleoso com odor adocicado de rosas menos intenso que o geraniol
Coeficiente de Partição (Log P)	2,6	--
Densidade (g/mL)	$d_4^{20} = 0,8894$	$d^{15} = 0,8813$
Índice de Refração (n_D^{20})	1,4766	1,4740
Solubilidade	Praticamente insolúvel em água (~ 100 mg/L a 25 °C). Miscível em álcool e éter	Solúvel em álcool absoluto
Uso	Em perfumaria.	Base para preparação de perfumes

MM – Massa molecular; CAS – Chemical Abstract Service; P = octanol / água a 25 °C.

Fonte: (The Merck, 2008; NIST, 2011).

3.3 Propriedades Antimicrobianas do Citral

O óleo volátil de *Cymbopogon citratus*, cujo citral é componente principal, foi objeto de pesquisa em diversos estudos no Laboratório de Controle de Qualidade Farmacêutico (LCQFar) da Faculdade de Farmácia da UFRGS. A atividade antifúngica deste óleo volátil foi avaliada *in vitro* por Schuck e colaboradores (2001) e Silva (2005) apresentando excelente atividade contra diversas espécies de *Candida* e fungos dermatófitos. Os ensaios microbiológicos por difusão em ágar com o óleo de *C. citratus* realizados por Silva (2005) mostraram inibição total do fungo *Trichophyton rubrum* – causa mais comum de onicomicoses (RODGERS, BASSLER, 2001).

A Tabela 3.3 resume alguns estudos encontrados na literatura científica que relacionam óleos voláteis contendo citral e geraniol e atividade antimicrobiana. Apesar dos estudos empregarem diferentes métodos de detecção de atividade antimicrobiana, dos óleos possuírem variações nas porcentagens de citral e geraniol e as concentrações inibitórias variarem, é evidente a ação do citral e geraniol contra diferentes espécies de microrganismos, incluindo diferentes gêneros de bactérias e fungos.

Tabela 3.3. Atividade antimicrobiana de diferentes óleos voláteis contra diferentes espécies de microrganismos.

Óleo Volátil / Farmacógeno	Principal Componente (%)	Microrganismo Sensível (concentração inibitória em mg/mL)	Método	Referência
C. citratus	Citral	Candida spp (0,09-0,10)	Microdiluição	Khan <i>et al.</i> , 2012
Geraniol	Geraniol	9 bactérias (0,08-1,25)	Microdiluição	Ngan <i>et al.</i> , 2012
Nerol	Nerol	9 bactérias (0,16-1,25)		
C. citratus	Citral	<i>T. rubrum</i> (0,32)	Inibição (%) da biomassa seca	Khan, Ahmad, 2011
C. Martini	Geraniol			
Óleo de <i>C. citratus</i>	Citral	<i>S. aureus</i> (0,54) e <i>E. coli</i> (0,54)	Macrodiluição	Aiemsaard <i>et al.</i> , 2011
Citral	Citral	<i>S. aureus</i> (0,62) e <i>E. coli</i> (1,25)		
Geraniol	Geraniol	<i>S. aureus</i> (0,62) e <i>E. coli</i> (1,25)		
Citral	Citral	Quarenta e oito isolados de <i>C. albicans</i> (22 sensíveis com 0,32 mg/ml)	Microdiluição	Zore <i>et al.</i> , 2011
Óleo de <i>C. citratus</i>	Citral	<i>Salmonella enterica</i> (2,1) <i>Enterococcus faecalis</i> (1,0) <i>Staphylococcus aureus</i> (2,5)	Difusão por disco	Bassolé <i>et al.</i> , 2011
Folhas de <i>C. citratus</i>	Citral	<i>Penicillium italicum</i> (0,05) <i>Rhizopus stolonifer</i> (0,05) <i>Staphylococcus aureus</i> MRSA (0,05)*	Difusão com cilindros	Saddiq, Khayyat, 2010
Óleo de Gerânio	Geraniol	Isolados de <i>Candida albicans</i> (1,7 e 0,064)	Difusão por disco e Microdiluição	Zore <i>et al.</i> , 2010

 Continua...

Óleo de <i>Lippia rehmannii</i>	Citral	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i> , <i>Lasiodiplodia theobromae</i> , <i>Alternaria alternata</i> , <i>Botrytis cinérea</i> , <i>Rhizoctonia cinérea</i> , <i>Fusarium oxysporum</i> , <i>Penicillium digitatum</i> , <i>Alternaria citri</i> (3,0)	Macrodiluição	Linde <i>et al.</i> , 2010
Óleo das partes aéreas de <i>Thymus zygis</i>	Geraniol	Quatro espécies de <i>Candida</i> (0,64) Duas espécies de <i>Trichophyton</i> (0,32) Nove espécies de <i>Aspergillus</i> (0,64) Duas espécies de <i>Microsporium</i> (0,32)	Macrodiluição	Gonçalves <i>et al.</i> , 2010
Citral	Citral	<i>Trichophyton mentagrophytes</i> (0,1)	Macrodiluição	Park <i>et al.</i> , 2009
Óleo de <i>Lippia alba</i>	Citral	Seis espécies de <i>Aspergillus</i> (1,0) Quatro espécies de <i>Fusarium</i> (1,0) <i>Cladosporium cladosporioides</i> (1,0)	Microdiluição	Shukla <i>et al.</i> , 2009
Partes aéreas de <i>Lippia rehmannii</i> H.Pearson	Citral	<i>Escherichia coli</i> (0,20)	Diluição e posterior contagem em placas	Somolinos <i>et al.</i> , 2009
Óleo de <i>Cymbopogon martini</i>	Geraniol	<i>Microsporium gypseum</i> (0,2) <i>Trichophyton rubrum</i> (0,15)	Macrodiluição	Prasad <i>et al.</i> , 2009
Óleo de <i>C. citratus</i>	Citral	<i>Candida albicans</i> (0,03) <i>Rhodotorula glutinis</i> (0,03) <i>Schizosaccharomyces pombe</i> (0,02) <i>Saccharomyces cerevisiae</i> (0,02) <i>Yarrowia lypolitica</i> (0,03)	Difusão por disco impregnado	Sacchetti <i>et al.</i> , 2005

Continua...

Óleo de <i>C. Citratus</i>	Citral	<i>Escherichia coli</i> (0,2) <i>Candida albicans</i> (0,2) <i>Staphylococcus aureus</i> (0,2)	Difusão com cilindros	Schuck <i>et al.</i> , 2001
Óleo de <i>C. Citratus</i>	Citral	<i>Trichophyton rubrum</i> (0,05) <i>Trichophyton mentagrophytes</i> (0,025)	Macrodiluição	Inouye <i>et al.</i> , 2001

* MRSA – *S. aureus* metilina resistente.

3.4 Mecanismo de Ação

Existem diferentes mecanismos de ação estudados e caracterizados que podem ser alvo de antifúngicos. A Figura 3.3 resume alguns destes alvos (BOHN, KRAEMER, 2000).

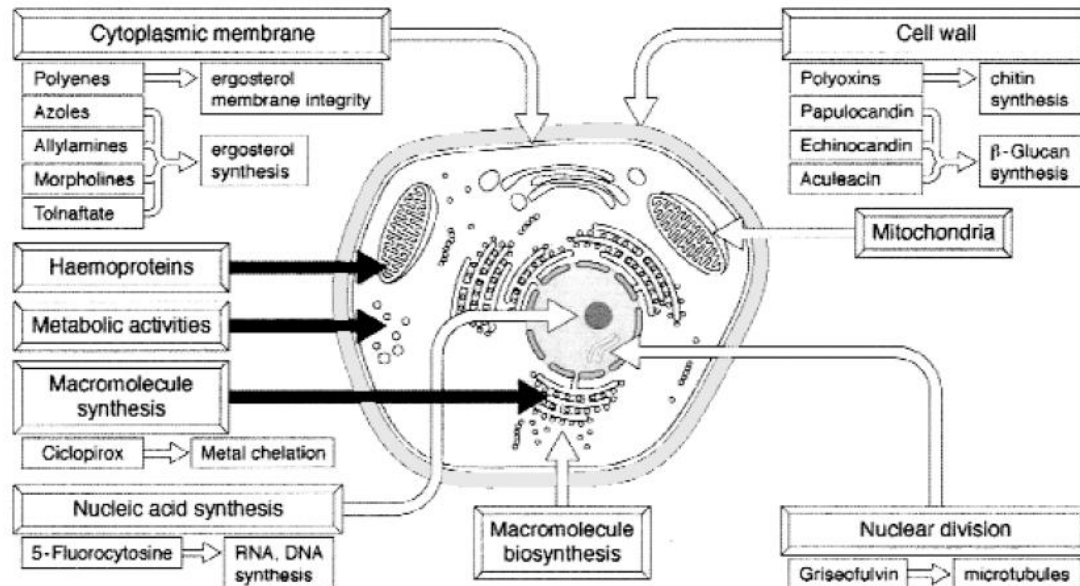


Figura 3.3. Alvos para ação de antifúngicos.

Fonte: Bohn & Kraemer, 2000.

Alguns métodos microbiológicos são empregados para melhor compreensão do mecanismo de ação de substâncias que apresentam atividade antifúngica.

Dano à parede celular é um mecanismo de ação de agentes antifúngicos que provocam lise das células por diferença de pressão osmótica com o meio externo. Na presença de protetor osmótico essas células podem continuar a crescer mesmo com danos as suas paredes celulares. Sorbitol na concentração de 0,8 M é um estabilizador adequado da pressão osmótica. As equinocandinas (caspofungina, anidulafungina e micafungina) são exemplo de fármacos que possuem ação relacionada a dano na parede celular e agem bloqueando a síntese da parede celular do fungo via inibição da síntese de β -1,3 glicano (Figura 3.4) (FROST *et al.*, 1995).

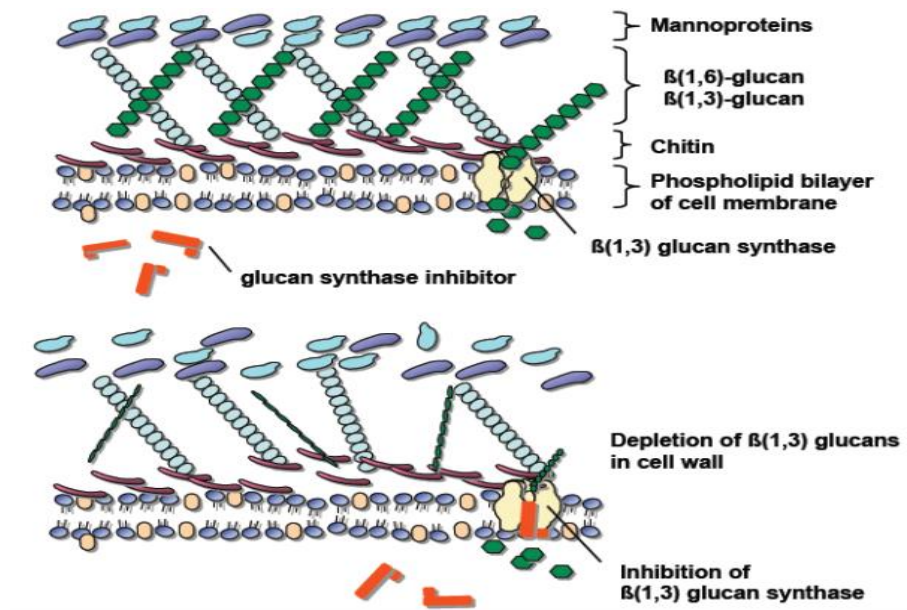


Figura 3.4. Representação esquemática do mecanismo de ação das equinocandinas.

Fonte: Sampayo, 2011.

Os esteróis são componentes lipídicos essenciais das membranas de eucariotos. Colesterol e ergosterol são exemplos de esteróis das membranas de mamíferos e fungos, respectivamente.

O mecanismo de ação dos polienos (anfotericina B e nistatina) pode ser associado a efeitos na membrana celular do fungo através da interação com ergosterol. A interação específica da anfotericina B com o ergosterol determina a formação de poros na membrana que leva a alterações na permeabilidade celular e efeito fungicida, pois permite a saída de metabolitos e íons intracelulares essenciais à sobrevivência da célula (Figura 3.5) (NEUMANN *et al.*, 2010).

A afinidade de uma molécula com o ergosterol pode ser estabelecida através de teste que determina o MIC na presença de ergosterol no meio extracelular. Este teste está baseado na oferta de ergosterol exógeno e, caso a molécula tenha afinidade, rapidamente irá formar um complexo, prevenindo a complexação com o ergosterol de membrana. Como consequência a MIC observada será aumentada. A anfotericina B é empregada como controle

positivo neste teste e o aumento do MIC para molécula teste confirma a interação com o ergosterol (CARRASCO *et al.*, 2012).

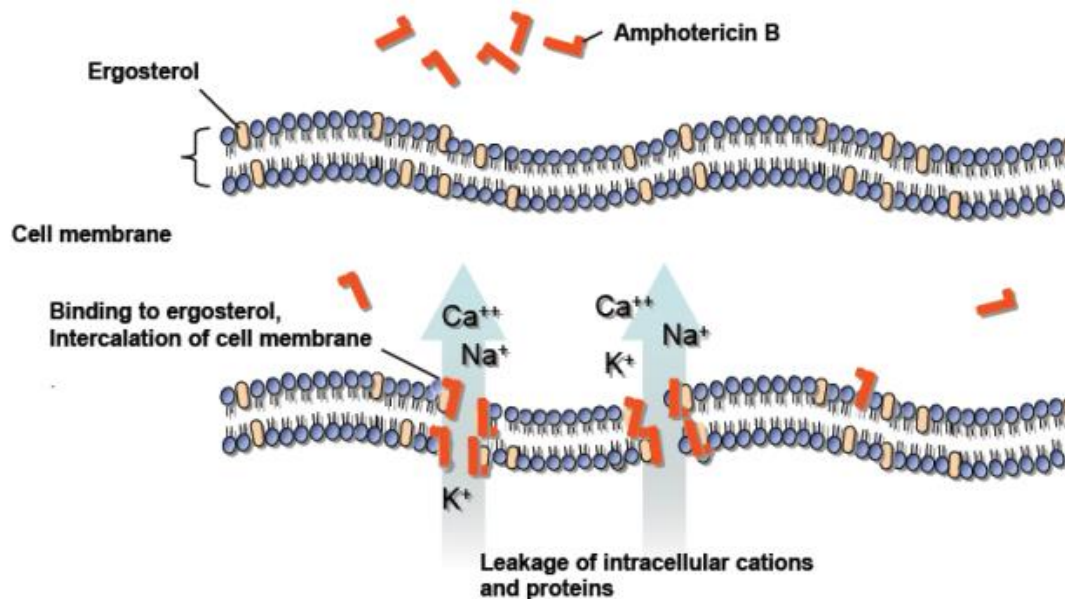


Figura 3.5. Representação esquemática do mecanismo de ação da anfotericina B.

Fonte: Sampayo, 2011.

Sikkema e colaboradores (1995) discutem detalhadamente a estrutura e função da membrana citoplasmática. Descrevem como principais características: (a) a função de barreira e transdução de energia que permitem a membrana formar gradiente de íons que podem guiar diversos processos endergônicos¹, e (b) formação e manutenção de matriz para proteínas.

A anfotericina B exerce seu efeito antifúngico em diferentes níveis celulares: efeito de membrana e intracelular. Na membrana, pode se ligar ao ergosterol, formar poros (Figura 3.6) ou simplesmente induzir o sequestro do ergosterol, resultando no rompimento da membrana plasmática. Dentro da célula, pode agir como um pró-oxidante e induzir o acúmulo de espécies reativas de oxigênio. No entanto, é possível que este efeito intracelular exija

¹ Processo ou reação química que ocorre em um sistema em que há absorção de energia (especialmente, energia livre) do meio externo, ou seja, é adicionada energia ao sistema.

ligação prévia com ergosterol. Como as espécies reativas de oxigênio são produtos da cadeia respiratória, não se pode descartar a influência da anfotericina B na atividade mitocondrial. O acúmulo de radicais livres tem efeito deletério em componentes essenciais da célula como: membrana, proteínas, DNA e mitocôndria, resultando em morte celular (MESA-ARANGO *et al.*, 2012).

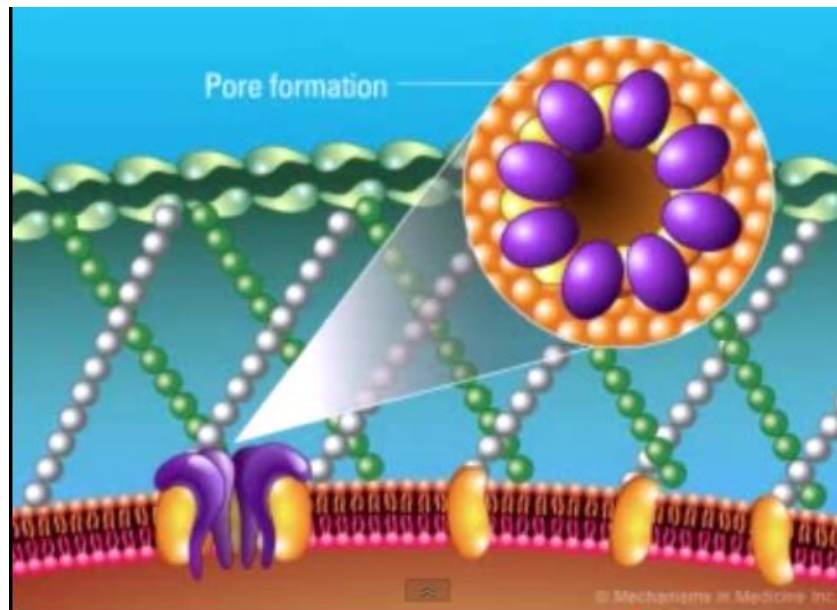


Figura 3.6. Ilustração dos poros formados pela anfotericina na membrana de fungos.

Fonte: Mechanisms in Medicine, 2012.

Park e colaboradores (2009) descreveram o efeito do citral em nível celular em cepa de *T. menthagrophytes* empregando as técnicas de Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) e Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET). Os autores verificaram redução da espessura e presença de descontinuidades da membrana citoplasmática, concluindo que a membrana parecia degradada. Os resultados com concentrações altas de terpenos (citral, eugenol, nerolidol e α -pineno) também mostram o colapso da membrana celular e, além disso, a estrutura anormal da mitocôndria (Figura 3.7).

Lima e colaboradores (2012) verificaram a interação do citral com ergosterol e não observaram alteração do MIC, afirmando que o citral não interage com ergosterol. Deve-se considerar que as MICs dos microrganismos testes (*C. albicans*) eram altas (512 e 1024 $\mu\text{g.mL}^{-1}$).

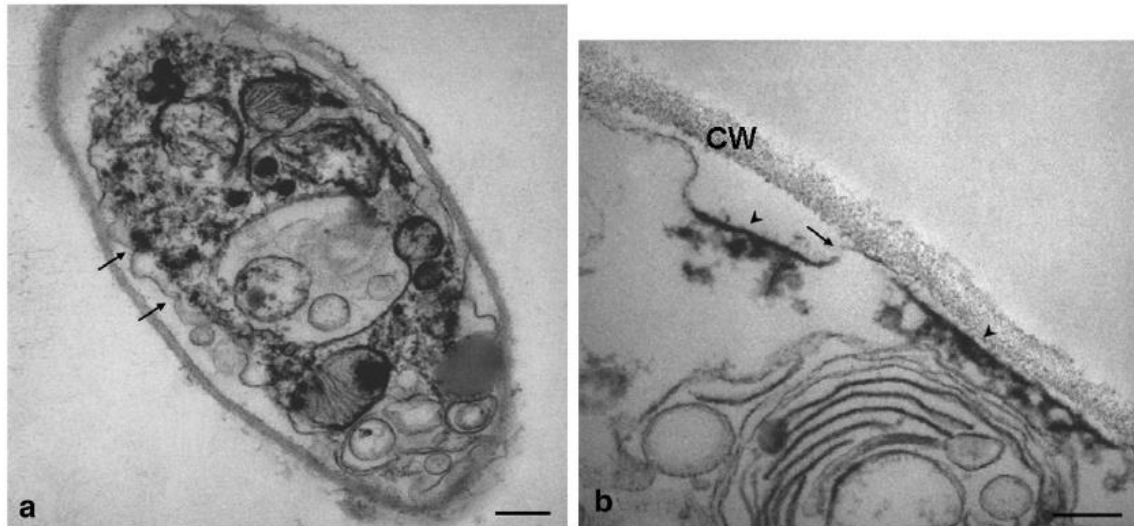


Fig. 6. Transmission electron micrographs of *T. mentagrophytes* hyphae. (a) Hypha exposed to 0.09 mg/ml citral. Note the separation of plasma membrane from the cell wall (arrows). Bar = 200 nm. (b) Hypha exposed to 0.2 mg/ml citral. Note the local thickening (arrowheads) and discontinuity (an arrow) of plasma membrane. Bar = 100 nm.

Figura 3.7. Microscopia Eletrônica por Tansmissão de *T. mentagrophytes* exposto ao citral.

Adaptado de: Park *et al.*, 2009.

3.5 Estabilidade

O citral possui um grupamento aldeído que é suscetível a reações químicas em condições de armazenagem e em água. A reatividade e reações de adição às ligas dupla carbono-oxigênio são altamente dependentes do caráter positivo do átomo de carbono do grupo carbonila. A introdução de grupos que exercem efeito doador de elétrons irá reduzir a reatividade (Figura 3.8.a). Assim, esperar-se-ia alta reatividade, especialmente em água, do citral com substâncias nucleofílicas. Contudo, a liga dupla conjugada presente no citral confere maior estabilidade (Figura 3.3.b) (SYKES, 1969).

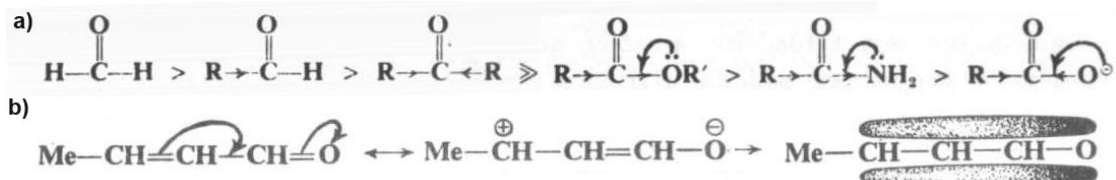


Figura 3.8. a) Reatividade de grupamentos carbonila; b) distribuição eletrônica em composto com liga dupla conjugada.

Mesmo sendo relativamente mais estável, alguns estudos demonstram baixa estabilidade do citral em formulações contendo proteínas - que comumente possuem grupamentos nucleofílicos - ou compostos nitrogenados nucleofílicos (DJORDJEVIC *et al.*, 2008; MEI *et al.*, 2010). Os tempos de meia-vida nestas situações podem não chegar a 30 dias em armazenagem a 20 °C. Em preparações contendo água, a estabilidade do citral é extremamente dependente do pH. Segundo Choi e colaboradores (2009), durante estudo de seis dias do citral em formulação contendo água, não houve degradação em pH 7,0 e a medida que o pH do meio se torna mais ácido a degradação aumenta, conforme mostra a Figura 3.9. Com base nestes dados o $t_{90\%}$ é obtido em menos de um dia em pH 3,0 e em 3 dias em pH 6,0. Em pH 7,0 não houve redução do teor de citral em 6 dias.

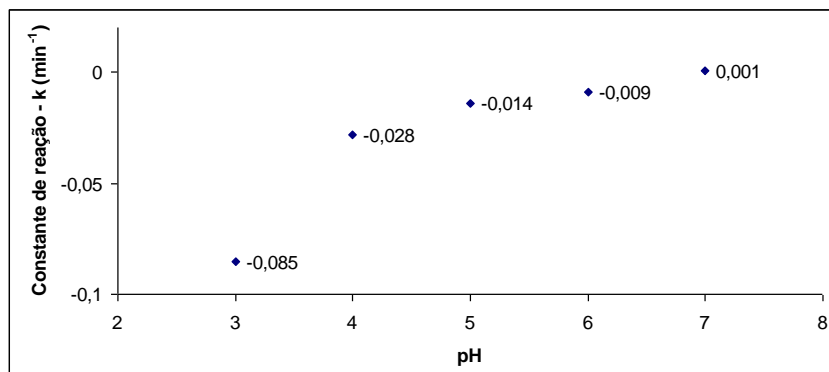


Figura 3.9. Degradação do citral em função do pH.

Adaptado de: CHOI *et al.*, 2009.

Outra possibilidade de degradação do citral é através da oxidação e formação dos isômeros: ácido gerânico (*trans*, CAS 459-80-3) e ácido nérico (*cis*, CAS 4613-38-1) (Figura 3.10). O ácido gerânico pode ser encontrado no óleo de *C. citratus* (MASUDA *et al.*, 2008) ou obtido por oxidação do citral (PICKETT *et al.*, 1980).

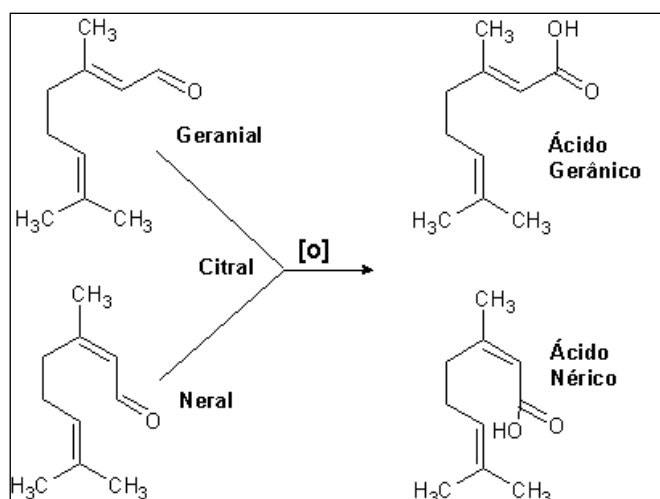


Figura 3.10. Oxidação do citral e formação dos isômeros ácido gerânico e ácido nérico.

Yang e colaboradores (2011) apresentam algumas substâncias oriundas da degradação do citral em emulsões. As principais substâncias encontradas foram: 2-heptanona, 1-octen-3-ol, δ -2-careno, p-cresol, R,p-dimethylstyrene, butanoic acid, p-mentha-1,5-dien-8-ol, p-methylacetophenone. Os autores propõem, também, rota de degradação para o citral (Figura 3.11).

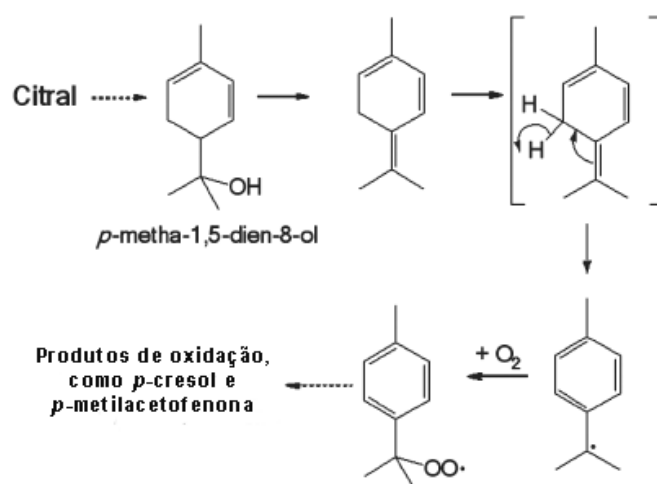


Figura 3.11. Produtos de oxidação do citral em nanoemulsões.

Adaptado de: Yang *et al.*, 2011.

Weisheimer e colaboradores (2010) demonstraram melhora na estabilidade do citral em complexos de inclusão com ciclodextrinas e detectou-

se mais de 85% de citral após acondicionamento dos pós a 40 °C. Outra abordagem com efeito na estabilidade do citral foi a estabilização de emulsões com proteína isolada do leite (CHOI *et al.*, 2009). Neste caso, a adição de tensoativos positivos, como a proteína do leite em pH 3,0, conferiu positividade às gotas das emulsões de óleo em água e resultando em melhor estabilidade do citral. Contudo, a degradação ainda é grande com 40% do citral degradado em 7 dias (CHOI *et al.*, 2010). Outros estudos com goma arábica, octadecano e partículas positivas mostram alguma proteção do citral, porém sem resultado expressivo (DJORDJEVIC *et al.*, 2007; MEI *et al.*, 2010; YANG *et al.*, 2012). Microemulsão contendo triacetina e triacilglicerídeos de cadeia média foram mais efetivos na proteção do citral e em 7 dias menos de 10% havia degradado (CHOI *et al.*, 2009). O uso de antioxidantes em nano emulsões foi utilizado como estratégia para melhorar a estabilidade do citral. As formulações com β -caroteno obtiveram os melhores resultados (aproximadamente 20% de degradação em 30 dias a 25 °C (YANG *et al.*, 2011).

O grupamento álcool do geraniol e nerol os torna bem menos reativos e espera-se uma reatividade muito menor destes isômeros se comparados com os isômeros do citral. Os isômeros geraniol e nerol são oxidados por enzimas específicas e os produtos de sua oxidação também podem ser os ácidos gerânico e nérico (BERGER *et al.*, 1990).

3.6 Caracterização e Propriedades da Unha

As unhas humanas recobrem e protegem a parte dorsal terminal dos dedos das mãos e pés. A palavra unha deriva do latim *úngula* que significa lâmina dura semitransparente que reveste a extremidade dos dedos de mãos e pés e, por isso, tecnicamente, também é chamada de lâmina ungueal (RIBEIRO *et al.*, 1995). As unhas aumentam a percepção sensorial na ponta dos dedos, facilitam a manipulação de objetos e contribuem para regulação da temperatura (BERKER *et al.*, 2007).

As unhas humanas possuem, aproximadamente, 0,5-1,0 mm de espessura; são naturalmente convexas, translúcidas, duras e pouco elásticas; são formadas, basicamente, por 25 camadas de células achatadas

queratinizadas mortas, conectadas fortemente por numerosas ligações intercelulares, grânulos de revestimento de membrana e desmossomos (MURDAN, 2002; NOGUEIRAS-NIETO *etal.*, 2011).

A quantidade total de lipídeos na unha é de, aproximadamente, 0,1-1,0% e difere consideravelmente do extrato córneo (cerca de 10%). O principal plastificante é a água e, normalmente, corresponde a 18% da massa da unha. Estima-se que com menos de 16% de água a unha fique quebradiça e com mais de 25%, macia e mais flexível. A quantidade de enxofre é de, aproximadamente, 10%, principalmente presente na forma de ligações dissulfeto que interligam as fibras da queratina e concedem resistência à unha (WALTERS *et al.*, 2012). Quimicamente, cerca de 80% das fibras de queratina são do tipo dura² que compõem principalmente os cabelos, enquanto que o restante é formado por queratina macia¹ do tipo verificado na pele (MURDAN, 2002).

A estrutura da unha pode ser dividida em três camadas: dorsal, intermediária e ventral. A camada dorsal possui poucas células de espessura, é rica em queratina (tipos dura e macia), grupos sulfidril, cálcio, fosfolipídeos e possui baixa atividade da enzima fosfatase ácida. A camada intermediária corresponde a, aproximadamente, três quartos da espessura da unha, é mais rígida (formada por queratina dura), possui alta atividade da fosfatase ácida, baixos níveis de cálcio e fosfolipídeos e um grande número de ligações dissulfeto. A parte ventral é composta de 1-2 camadas de células sustentadas pela base da unha e, como a camada dorsal, é rica em cálcio, fosfolipídeos e grupos sulfidril. Além disso, possui características similares à camada intermediária (alta atividade da fosfatase ácida e muitas ligações dissulfeto) (MURDAN, 2002; NOGUEIRAS-NIETO *etal.*, 2011).

² Tradução livre para *hard type keratin* e *soft type keratin*.

3.7 Infecções Fúngicas na Unha

As unhas podem ser afetadas por diversos distúrbios, como, por exemplo, discoloração (causada por certos fármacos de uso sistêmico), tornarem-se quebradiças (pelo uso de detergentes em excesso), encravadas, infectadas, etc (MURDAN, 2002). As duas causas mais comuns de doenças que afetam as unhas são as onicomicoses e psoríase. Estima-se que na Europa, as onicomicoses, atinjam 3-10% da população, sendo que a prevalência aumenta em idosos (PIERARD, 2001). Além disso, estima-se que 50% das doenças nas unhas e 30% das infecções cutâneas são causadas por fungos (THOMAS *et al.*, 2010).

As onicomicoses são infecções fúngicas das unhas dos dedos das mãos e pés, sendo que os principais microrganismos causadores de onicopatias são: dermatófitos (90%), leveduras (7%), fungos não-dermatófitos (3%) (EINARSON *et al.*, 1996, REPKA *et al.*, 2004). Por sua vez, os dermatófitos são os microrganismos que causam infecções de tecidos queratinizados (por exemplo, pele, cabelos e unhas). Estes microrganismos pertencem a três gêneros: *Trichophyton*, *Epidermophyton* e *Microsporum*. Os dermatófitos podem, ainda, ser categorizados em: antropofílicos (infectam predominantemente humanos), geofílicos (encontram-se na terra e podem infectar humanos e animais) e zoofílicos (infectam, geralmente, mamíferos não humanos) (GUPTA *et al.*, 1998).

As principais espécies relacionadas às onicomicoses em humanos são: *Trichophyton rubrum* e *Trichophyton mentagrophytes* - a quem são atribuídas 80-90% dos casos. Aos fungos não-dermatófitos, como *Alternaria spp.*, *Aspergillus spp.*, *Fusarium spp.*, *Scytalidium spp.* e *Scopulariopsis*, são atribuídos 2-11% dos casos. Leveduras, incluindo as espécies de *Candida* somam entre 2-10% das infecções em unhas (REPKA *et al.*, 2004; THOMAS *et al.*, 2010). É importante ressaltar que alguns estudos demonstram tendência no sentido do aumento da prevalência de onicomicoses. Nos Estados Unidos, verificaram-se as seguintes prevalências: 2,18% no ano de 1979 com $n = 20000$ (THOMAS *et al.*, 2010), 8,7% em 1997 com $n = 1038$ (ELEWSKI, CHARIF, 1997) e 13,8% em 2000 com $n = 1832$ (GHANNOUM *et al.*, 2000). Um levantamento na Europa (englobando Bélgica, Holanda, Luxemburgo,

Suíça, Hungria, Grã Bretanha e Polônia) e leste asiático em praticantes de esportes (China, Coreia do Sul e Ilha Formosa) apresentou prevalências altíssimas na ordem de 26% e 22%, respectivamente (CAPUTO *et al.*, 2001).

Estudos no Brasil tem mostrado alguma divergência com relação à prevalência das espécies de microrganismos. Estudo realizado por Araújo e colaboradores (2003) em 2.271 pacientes diagnosticou onicomicose em 400 deles (17,6%), sendo que 2/3 estavam infectados nas unhas dos pés e 1/3 nas mãos. As leveduras do gênero *Candida* foram os principais agentes patogênicos nas unhas das mãos de mulheres e os dermatófitos dos pés dos pacientes em geral. Em outro estudo com 761 pacientes diagnosticados com onicomicoses em Maringá-PR, foi verificado 71% de prevalência nas unhas dos pés e 29% na das mãos. As mulheres representavam mais de 70% dos pacientes diagnosticados positivamente e a prevalência de leveduras como agente infeccioso foi de 46% dermatófitos, 41% de leveduras e 13% de não-dermatófitos (SOUZA *et al.*, 2007).

Clinicamente, as onicomicosis podem ser classificadas segundo a região da unha humana (Figura 3.12.a) onde a infecção começa:

- Onicomicose subungueal distal e lateral (Figura 3.12.b): a infecção fúngica começa no hiponíquio e no leito distal ou lateral da unha;
- Onicomicose superficial branca (Figura 3.12.c): a lâmina ungueal é invadida diretamente pelo patógeno e manchas brancas aparecem na lâmina. As manchas podem coalescer e a lâmina pode perder resistência e se fragmentar facilmente;
- Onicomicose subungueal proximal: o fungo invade a parte proximal da unha e penetra na região formadora da unha (matriz), produzindo discoloração branca na lúnula;
- Onicomicosis totalmente distrófica (Figura 3.12.d): este é o fim potencial de toda onicomicose. Toda lâmina e leito são invadidos pelo fungo.

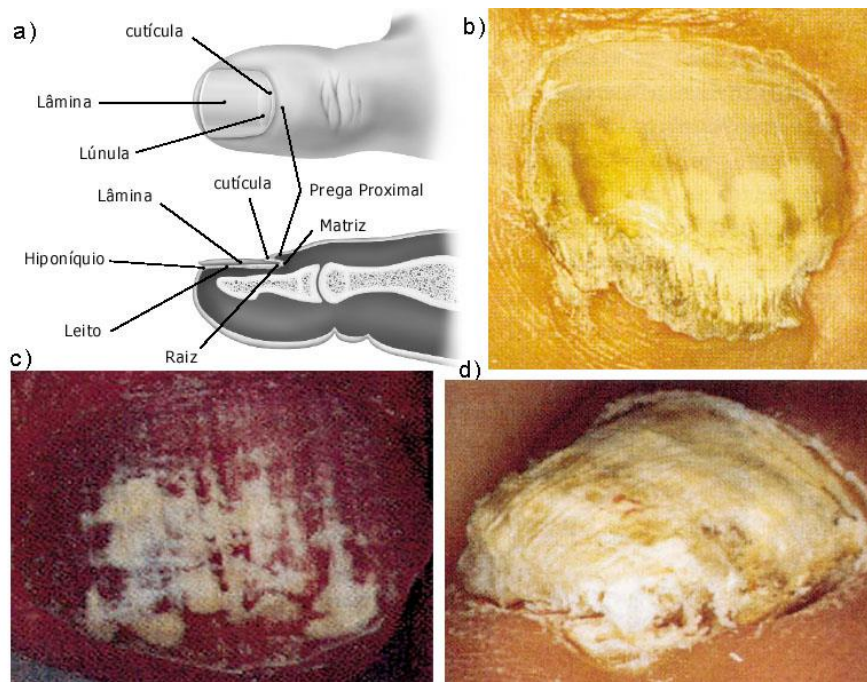


Figura 3.12. a) Anatomia da unha; b) onicomicose subungueal distal; c) onicomicose superficial branca; d) onicomicose distrófica total.

Adaptado de: MURDAN, 2002.

3.8 Caracterização da Queratina

A queratina é uma mistura complexa de proteínas que são extraídas de tecidos epiteliais de vertebrados e possuem propriedades físico-químicas específicas. A queratina encontra-se na forma de heterodímeros, tetrâmeros, protofilamentos e protofibrilas que, finalmente, formam filamentos. Cerca de 38-45% da queratina possui conformação em α -hélice mantidas por pontes de hidrogênio e ligações dissulfeto. A estrutura final da queratina é obtida pela ligação/interação de proteínas filamentosas com baixo teor de enxofre que encontram-se embebidas numa matriz não filamentosa composta de proteínas ricas em enxofre (cisteína, principalmente), além de proteínas com alto teor de glicina/tirosina que são responsáveis pela associação dos filamentos. Os níveis estruturais mais altos da queratina são estabilizados por ligações dissulfeto que conferem as propriedades mecânicas de barreira e resistência (BRAGULLA, HOMBERGER, 2009; NOGUEIRAS-NIETO *et al.*, 2011).

A queratina é resistente à maioria das proteases (incluindo pepsina e tripsina) e são insolúveis em ácidos e bases diluídos, água ou solventes orgânicos. No entanto, as queratinas podem ser extraídas de diversos tecidos por ureia e/ou agentes redutores, que clivam as ligações dissulfeto, como: tioglicolato de sódio, ditioneitol ou mercaptoetanol (BRAGULLA, HOMBERGER, 2009). Um método de extração de queratina de tecidos biológicos bastante utilizado emprega a Solução de Shindai (Tampão Tris 25 mM pH 8,5, tiourea 2,6 M, ureia 5 M e 2-mercaptoetanol 5%) e obtém excelentes rendimentos nos mais diversos tecidos (pele, cabelos, pelos, unha). O emprego de pH básico, ureia e um agente redutor com grupamento sulfidril (ditioneitol, 2-mercaptoetanol, tioglicolato) como solução extratora de queratina é praticamente uma constante e variantes desta solução comumente são as que obtém melhores rendimentos (KITAHARA, OGAWA, 1991; NAKAMURA *et al.*, 2002; REICHL, 2009; LUSIANA *et al.*, 2011).

É importante ressaltar que a queratina expressa por humanos e bovinos é muito similar em tamanho, carga elétrica e imunorreatividade. Além disso, os cascos de bovinos e as unhas humanas compartilham a propriedade de serem constituídos por diferentes tipos de queratina que são característicos de epitélio cornificado/queratinizado macio e duro, enquanto que a maioria dos tecidos produz apenas um dos tipos (BRAGULLA, HOMBERGER, 2009). Além disso, ambos os tecidos (cascos e unhas) são compostos, principalmente, por α -queratina. Porém, se supõe que a malha de queratina nos cascos seja menos densa que nas unhas (menor conteúdo de cisteína e de ligações dissulfeto nos cascos) (MURDAN, 2002). Outra diferença ocorre na capacidade de hidratação. Khengar e colaboradores (2007) demonstraram que os cascos bovinos aumentam mais de peso, quando expostos à água, do que as unhas ($40\pm 9\%$ e $27\pm 3\%$, respectivamente).

3.9 Cascos Bovinos como Modelo de Permeação para Unha Humana

Estudos de permeação de fármacos são realizados com modelo *in vitro* empregando cascos bovinos finamente fatiados de maneira a simular o efeito

de barreira da unha humana (MERTIN, LIPPOLD, 1997a; MERTIN, LIPPOLD, 1997b; MERTIN, LIPPOLD, 1997c; KHENGAR *et al.*, 2007; LUSIANA *et al.*, 2011; MONTI *et al.*, 2011; NOGUEIRAS-NIETO *et al.*, 2011; NOGUEIRAS-NIETO *et al.*, 2013). As principais vantagens do modelo com cascos bovinos são: a facilidade de obtenção e as maiores dimensões das membranas fatiadas que facilmente se adaptam às células de difusão convencionais (MONTI *et al.*, 2011).

Mertin & Lippold (1997c) calcularam o coeficiente de permeabilidade (P) para cinco substâncias (paracetamol, fenacetina, diprofilina, cloramfenicol e iopamidol) em condições experimentais equivalentes diferindo somente pelas membranas (unhas humanas ou cascos bovinos). A permeabilidade foi sempre maior para as membranas obtidas a partir de cascos bovinos, sendo que o aumento da permeabilidade variou de 12 a 144 vezes em relação à membrana obtida com unha humana. A maior diferença (144 vezes) foi verificada para o fármaco iopamidol que possui alto peso molecular ($PM = 777,1 \text{ g/mol}$) em relação às demais substâncias avaliadas (maior PM das outras moléculas igual a $323,1 \text{ g/mol}$ para o cloramfenicol).

Monti e colaboradores (2011) compararam os resultados de fluxo de ciclopirox por membranas obtidas de cascos bovinos e unhas humanas ($6,90$ e $0,52 \text{ } \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}\cdot\text{dia}^{-1}$, respectivamente). O resultado foi um maior fluxo (aproximadamente, 13 vezes) do ciclopirox pela membrana de cascos bovinos. Finalmente, Nogueiras-Nieto e colaboradores (2011) descrevem a causa do aumento do fluxo e permeabilidade em cascos bovinos em relação a unhas humanas empregando métodos de análise de diâmetro de poro (porosimetria de mercúrio e microscopia eletrônica de varredura). Neste estudo, verificou-se que a distribuição dos diâmetros dos poros em ambos os tipos de membrana são similares (média de, aproximadamente, $10 \text{ } \mu\text{m}$), porém a membrana de cascos bovinos possui mais poros (“mais vazada”) por unidade de área. Além disso, fatores muito discutidos como hidratação e presença de agente de permeação (acetilcisteína, neste caso) demonstraram novamente, que não se verifica aumento no diâmetro dos poros das membranas e sim, um aumento no número de poros, especialmente quando as membranas foram tratadas previamente com acetilcisteína. Além disso, a relação entre a permeabilidade

em unhas humanas e cascos bovinos foi estabelecida por Mertin e Lippold (1997c) e pode ser verificada na forma da Equação 3.1 (Item 3.10 – Formulação para unhas)

3.10 Formulações para Unhas

O sucesso de uma terapia tópica contra onicomicoses é dependente da escolha apropriada do antifúngico e da formulação que maximize a difusão do fármaco através da unha até obter-se concentrações que excedam a concentração inibitória mínima do agente infeccioso (MARTY, 1995).

Formulações tópicas e orais continuam sendo a terapia de escolha para o tratamento de onicomicoses. Porém, o regime oral pode levar meses para tornar-se efetivo, pois requer grandes quantidades de fármaco na circulação para se ter concentração terapêutica local nas unhas. Além disso, a terapia sistêmica pode ser contra-indicada e possui efeitos adversos potenciais conhecidos. Tratamento tópico de onicomicoses é uma alternativa à terapia sistêmica de longo prazo (6 a 12 meses) comumente empregada (BROWN *et al.*, 2009).

Os resultados de Walters e colaboradores (1985) com uma série de alcoóis primários (de 1-10 carbonos) demonstra redução na permeabilidade através da unha à medida que se aumenta o peso molecular e a lipofília dos alcoóis. Este comportamento difere do observado na pele e levou os autores a caracterizar a unha como tendo propriedades de um gel hidrofílico (WALTERS *et al.*, 1983; WALTERS *et al.*, 1985). Isto leva a primeira implicação, que o fluxo máximo de fármaco por uma membrana do tipo gel hidrofílico aumenta com o aumento da solubilidade do ativo no veículo (aumento do gradiente de concentração). Isto é comprovado por Mertin e Lippold (1997a), em estudo que compara paracetamol e fenacetina (ambos possuem pesos moleculares semelhantes, 151,2 e 179,2 g/mol, respectivamente, porém, solubilidades em água distintas, 16,8 e 0,95 g.L⁻¹, respectivamente), no qual se verifica fluxo máximo praticamente dez vezes maior para o fármaco com maior solubilidade. Outra implicação é que o aumento do volume molecular (que pode ser substituído por peso molecular) reduz a permeabilidade. Mertin e Lippold

(1997c) e Kobayashi e colaboradores (2004) comprovam isto através da análise de uma série de substâncias com peso molecular crescente que mostram permeabilidade decrescente. Considerando as propriedades de gel hidrofílico - tanto das unhas quanto dos cascos - Mertin e Lippold (1997c) propuseram uma relação entre as permeabilidades de um fármaco na unha humana e em cascos bovinos (Equação 3.1):

$$\text{Log}P_U = 3,723 + 1,751\text{Log}P_C \quad (3.1)$$

Onde: P_U e P_C são os coeficientes de permeabilidade tendo como barreira a unha ou casco bovino, respectivamente.

Apesar de ter necessário cuidado com o uso e extrapolações da Equação 3.1, esta apresentou excelente correlação entre os coeficientes de permeabilidade P_U e P_C ($r = 0,971$), que de certa forma valida o uso de cascos como modelo *in vitro* inicial para o teste de formulações farmacêuticas.

Mertin e Lippold (1997c) avaliaram a permeação de diferentes antifúngicos por membranas de cascos bovinos e para aqueles com peso molecular entre 200-400 g/mol verificou-se P médio (\pm desvio padrão) de 9,63 ($\pm 3,56$) $\text{cm}^2 \cdot \text{h}^{-1}$. O meio doador e receptor foi composto de etanol 42% com tampão fosfato pH 8,1. Além disso, os autores determinaram um parâmetro de eficiência antimicótica relativo (E) através da equação a seguir:

$$E = \frac{J_{max}}{MIC} \quad (3.2)$$

Onde: E é a eficiência calculada, MIC é a concentração inibitória mínima do microrganismo e J_{max} é o fluxo de fármaco a partir de uma solução supersaturada garantindo condições *sink* no meio receptor.

Apesar de ter pouco ou nenhum significado farmacológico a eficiência calculada pela Equação 3.2 é um bom parâmetro de comparação e ferramenta para escolha de potenciais formulações/fármacos.

Mertin e Lippold (1997b) também avaliaram o efeito do tipo de veículo, matriz e da concentração de cloranfenicol no fluxo através de unhas e cascos. O fluxo máximo (solução de cloranfenicol saturada em tampão fosfato 7,4, n-octanol, triglicerídeos de cadeia média) foi semelhante para todos os veículos

demonstrando que o fluxo é independente do veículo. Porém, é importante que o veículo permita altas concentrações de fármaco para garantir a manutenção de fluxo constante por longos períodos minimizando o número de aplicações. Este trabalho também observou que a quantidade permeada de fármaco em um filme de Eudragit® RL é inicialmente controlada pela membrana e posteriormente pela matriz da formulação. Além disso, esmaltes com formação de filme (formulação de cloranfenicol com Eudragit® RL) tiveram o mesmo fluxo máximo que as soluções saturadas. No entanto, nas unhas a fase *lag* foi muito superior no caso do esmalte (400 h) do que com a solução (200 h).

Kobayashi e colaboradores (1998) testaram diferentes promotores para aumento da absorção de 5-fluoruracil e tolnaftato através de unhas humanas. O resultado foi maior fluxo para as formulações que continham acetilcisteína e 2-mercaptoetanol, enquanto que a ureia apresentou resultado inferior ao controle (água como veículo). Uma série de substâncias (mercaptanos, sulfitos, agentes queratolíticos e tensoativos) foram testadas por Malhorta & Zatz (2002), porém o controle contendo acetilcisteína 5% e ureia 20% obteve os melhores resultados de permeação pela unha.

Myoung & Choi (2003) relatam a preparação de adesivos com diferentes polímeros, sendo que os derivados do ácido acrílico apresentaram melhores resultados de fluxo através dos cascos de suínos. Neste estudo, diferentes promotores foram avaliados, destacando-se o DMSO, propilenoglicol 400 (PPG 400) e o mercaptoetanol, que duplicaram o fluxo de ciclopirox em relação ao controle. As formas de sal e ácido (não-ionizado) do ciclopirox foram avaliadas e o sal obteve valores um pouco maiores de fluxo em relação ao fármaco na forma ácida. Como o sal é mais solúvel, evidencia-se a importância da solubilidade do fármaco, uma vez que a unha e cascos são, como modelo, considerados géis hidrofílicos.

Brown e colaboradores (2009) relatam pré-tratamento químico com ácido tioglicólico seguido de ureia e peróxido de hidrogênio por 20 h. Em relação ao controle, o pré-tratamento aumentou o fluxo dos fármacos entre 4 – 18 vezes.

O estudo de Traynor e colaboradores (2010) apresenta novo experimento para avaliação da permeação através da análise da redução da

atividade dos fungos que infectam a parte posterior de uma unha tratada com diferentes produtos. Neste estudo, a terbinafina apresentou excelentes resultados, superando os efeitos dos produtos comerciais contendo amorolfina e ciclopirox.

Shivakumar e colaboradores (2010) apresentam uma nova estratégia para minimizar os problemas relacionados às formulações hidrofílicas, que geralmente possuem baixa adesividade e são removidas facilmente por água e atrito. Estes inconvenientes foram vencidos através da formação de dupla camada: primeiro o gel hidrofílico é aplicado e, em seguida, deixado evaporar e, após 5 min é aplicado esmalte. Os resultados demonstram que a estratégia da dupla camada, praticamente, duplicou o fluxo de terbinafina em relação à aplicação do gel hidrofílico como monocamada.

3.11 Cálculos para Obtenção do Fluxo e Coeficiente de Permeabilidade

O estudo do movimento de moléculas em solução e do transporte molecular através de barreiras/membranas artificiais ou biológicas pode ser descrito matematicamente e pode auxiliar no desenho dos experimentos e interpretação dos resultados (WANG, ZHMEIS, 2006; BRODIN *et al.*, 2009).

O transporte de moléculas através de uma membrana pode ser medido pelo seu fluxo. O fluxo de um soluto pode ser definido como a massa ou número de moléculas movendo-se através de uma secção de área durante um determinado período de tempo (Equação 3.3):

$$J = \frac{dm}{dt \times A} \quad (3.3)$$

Onde: J é o fluxo de massa m através de uma secção de área A durante um período de tempo t . O fluxo pode ser expresso por diversas unidades e neste trabalho será expresso como: $\mu\text{g} \cdot \text{cm}^{-2} \cdot \text{h}^{-1}$.

O coeficiente de permeabilidade (P) pode ser estimado a partir de um simples experimento de fluxo (em que amostras do líquido receptor são

coletadas e o soluto quantificado) para um dado gradiente de concentração e uma espessura h da membrana. O coeficiente de permeabilidade pode ser obtido a partir da simplificação da Lei de Fick (Equação 3.4):

$$\frac{dM}{dt} = \frac{D_B \times A}{h_B} (C_{BD} - C_{BR}) \quad (3.4)$$

Onde: dM/dt é a quantidade de massa permeada por tempo, D_B é o coeficiente de difusão efetivo da barreira/membrana, h_B é a espessura da barreira/membrana, C_{BD} e C_{BR} são as concentrações do fármaco na barreira no lado doador e receptor, respectivamente.

Como a concentração na barreira é comumente desconhecida, C_{BD} pode ser substituído por $PC_{B/V} \cdot C_V$, onde $PC_{B/V}$ é o coeficiente de partição barreira/veículo e C_V é a concentração do fármaco no veículo no lado doador da barreira. O termo $D_B PC_{B/V}$ é chamado de coeficiente de permeabilidade (P). Em condições onde não mais que 10% do fármaco presente no veículo doador penetrar a barreira, P pode ser calculado através da inclinação do gráfico de M vs t (Equação 3.5) (MERTIN, LIPPOLD, 1997a):

$$M = \frac{D_B \times P_{B/V} \times A \times C_V}{h_B} = \frac{P \times A \times C_V}{h_B} t \quad (3.5)$$

O valor de permeabilidade obtido pode ser comparado com os valores obtidos em outros estudos ou também pode ordenar uma classe de substâncias segundo sua permeabilidade (BRODIN *et al.*, 2009). Neste trabalho, P será representado na unidade de $\text{cm}^2 \cdot \text{h}^{-1}$.

**4 CAPÍTULO I – DETERMINAÇÃO DOS ISÔMEROS DO
CITRAL POR PLS-UV**

4.1 Introdução

A caracterização de óleos voláteis e quantificação de seus constituintes são desafiantes, assim como a separação e quantificação de isômeros. A espectrofotometria no ultravioleta (UV) pode ser uma alternativa rápida, simples e sensível para determinação de substâncias com grupamentos cromóforos em diferentes matrizes, incluindo análise de fármacos em medicamentos. Contudo, na análise de misturas pode haver sobreposição dos espectros de UV e a lei da aditividade das absorvâncias inviabiliza a análise direta por UV. A associação do método de espectrofotometria UV a técnicas matemáticas, como derivada e análise multivariada, tem solucionado, em muitos casos, a falta de seletividade deste método (FERREIRA *et al.*, 1999).

As técnicas de análise multivariada permitem a avaliação simultânea de múltiplas medições em indivíduos/unidades e são úteis quando variáveis aleatórias são relacionadas, pois a análise individual não leva a conclusões confiáveis (MINGOTI, 2005). A técnica dos mínimos quadrados parciais (PLS) tem, ultimamente, recebido considerável atenção na área da quimiometria para análise de misturas complexas. O PLS constrói um modelo de regressão a partir das componentes principais geradas entre as matrizes X e Y , sendo, no caso da análise por UV, matrizes das absorvâncias dos espectros UV e concentrações, respectivamente (HEMMATEENEJAD *et al.*, 2007).

O emprego do PLS necessita de uma etapa de calibração, na qual a relação entre os espectros e as concentrações dos analitos é deduzida de uma série de amostras de referência. Em seguida, é realizada a etapa de predição das concentrações das amostras em teste a partir de seus espectros e dos resultados da calibração (FERREIRA *et al.*, 1999; HEMMATEENEJAD *et al.*, 2007) .

4.2 Artigo

A seguir encontra-se artigo publicado na revista *Current Pharmaceutical Analysis* (v. 8, n. 4, p. 401-408, 2012) - Bentham Science Publishers. Este artigo descreve o desenvolvimento e otimização de método por PLS-UV para

determinação dos isômeros do citral em amostras do óleo e em complexos com ciclodextrinas.

Spectrophotometric Simultaneous Determination of Citral Isomers in Cyclodextrin Complexes with Partial Least Squares Supported Approach

Abstract

This article describes the development and optimization of a UV spectrophotometric method to evaluate the isomers of citral in cyclodextrins complexes by a partial least squares (PLS) regression model. The central composite design (CCD) associated with the response surface methodology (RSM) was applied to select the wavelength range that provides the best prediction results. β -cyclodextrin (β -CD) and hydroxypropyl- β -cyclodextrin (HP- β -CD) complexes with citral were prepared in ethanolic solution and spray dried. These samples were analyzed by an optimized PLS-UV model and the results compared with HPLC-UV determinations to evaluate the predictive power of the PLS-UV model. The results from the PLS-UV model showed a relative standard deviation of prediction (RSEP) ranging from 0.87% for neral up to 1.42% for geranial. The relative standard deviation (RSD) obtained in analyses of four replicates of citral-cyclodextrins complexes ranged from 2.2% to 4.1%. Geranial showed higher affinity than neral for both types of cyclodextrins evaluated. Finally, β -CD was shown to be a better complexing agent for citral than HP- β -CD.

Keywords: Citral, Cyclodextrins, Encapsulating Agents, Factorial Design, Geranial, HPLC, Isomers, Microencapsulation, Neral, PLS, UV, Volatile Oils.

Introduction

Citral (Figure 4.1) is a volatile oil consisting of two geometric isomers - neral (cis) and geranial (trans) [1]. It is commercially important in the food, cosmetics and pharmaceuticals industries, and is widely used as flavoring for

food, in the preparation of perfumes and as an intermediate of vitamin A [2]. Moreover, many studies have shown that citral has antibacterial, antifungal and antiviral activities [3-9].

Microencapsulation is an important process to improve the chemical stability of volatile compounds and to protect them against oxidation and evaporation. Cyclodextrins are well known for their ability to include apolar molecules inside their hydrophobic cavity. The complexation of volatile oils with cyclodextrins generally improves its stability and solubility [10].

Both the characterization and quantification of volatile oils and the separation and quantification of their isomeric constituents are still a challenge. The determination of citral isomers in different matrices is commonly performed by gas chromatography coupled with a mass spectrometry [11-13] or flame ionization detector [14]. Alternatively, liquid chromatography with UV detection has been used in normal [15] and reversed phase systems [16].

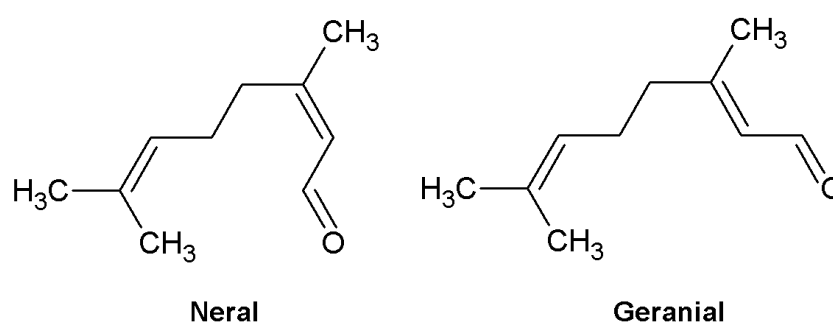


Figure 4.1. Chemical structures of citral isomers – neral and geranial.

UV spectrophotometry can be a fast, simple and sensitive alternative for the simultaneous determination of different active substances in different matrices. The combination of UV spectrophotometry with mathematical techniques, such as derivative and multivariate analysis, has, in many cases, solved the problem of lack of selectivity of this method [17-24]. Quantitative chemometric methods, particularly the method of partial least squares (PLS), have been extensively used. This is due primarily to the digital signal output from new devices and the development of advanced software for statistical applications [21-26].

PLS is defined as a method for building regression models on the principal components obtained from the decomposition of matrices X and Y (independent and dependent variables, respectively). Spectrophotometric analysis using the PLS method requires a calibration step in which the relationship between the spectra (X variable) and analyte concentrations (Y variable) is determined from a series of reference samples. The matrices obtained can be simultaneously decomposed into a sum of h principal components so that the relation for X and Y can be described as follows:

$$X = TP^T + E = \sum t_h p'_h + E \quad \text{Equation 1}$$

$$Y = UQ^T + F = \sum u_h q'_h + F \quad \text{Equation 2}$$

where X is an $n \times m$ matrix of predictors, Y is an $n \times p$ matrix of responses, T and U are $n \times l$ matrices of principal components (scores), P and Q are, respectively, $m \times l$ and $p \times l$ loading matrices, E and F are the residual matrices. Considering a spectrophotometric analysis, n is the number of samples, m is the number of wavelengths selected, p is the number of analytes, l is the number of principal components used. The X and Y matrices are correlated by the scores T and U , as follows:

$$u_h = b_h t_h \quad \text{Equation 3}$$

Where b_h is the regression coefficient for the h principal component. The matrix Y can be obtained from the X scores matrix, regression coefficients matrix and Y loading matrix, as follows:

$$Y = TBQ^T + F \quad \text{Equation 4}$$

The concentration of unknown samples is then predicted from its spectra data replacing the X scores matrix (T) with the new scores T^* (Eq. 5).

$$Y_{Pred} = T^* BQ^T \quad \text{Equation 5}$$

In this procedure, it is very important to find the maximum number of principal components to be used in the PLS model. It is theoretically possible to calculate as many principal components as the number of columns of X matrix (m); however, only a few principal components are normally used, because the smaller ones will only describe noise [25,27]. For predictive models, cross-

validation methods are usually performed and the number of principal components is established based on the determination of the minimum prediction error. The lack of prediction accuracy can be estimated by the predicted residual sum of squares (PRESS) (Eq. 6) [28].

$$PRESS = \sum_{i=1}^n \sum_{j=1}^m (C_{ij} - \hat{C}_{ij})^2 \quad \text{Equation 6}$$

where C_{ij} is the true concentration of the j th analyte in the i th sample; \hat{C} is the predicted concentration of the j th analyte in the i th sample; n is the number of samples and m is the number of analytes.

Several techniques are used to reduce systematic variations, select wavelengths and improve the results of the calibration by PLS. In general, these are complex techniques such as orthogonal signal correction (OSC), moving window selection strategy (MWSS) and genetic algorithms [23-25].

This article describes the application of the UV spectrophotometric technique associated with PLS to determine neral and geranial in cyclodextrin complexes. Derivative spectra of neral, geranial and mixtures were used to decrease background noise and increase the difference among the spectra of the isomers. The central composite design (CCD) associated with the response surface methodology (RSM) was applied to select the wavelength range and to improve the predictive results of neral and geranial. The optimized PLS-UV method was employed in complexation studies of citral with cyclodextrins.

Materials and methods

Reagents

The reagents used were: methanol and acetonitrile from Tedia® (Fairfield, USA) and ultrapure water produced by the Milli-Q Plus® filter system (Millipore, Bedford, USA). Citral Standard: purchased from Aldrich® (Saint Louis, USA), lot S22116, with a purity content of 97.1% (47.6% of neral, 49.5% of geranial). β -cyclodextrin (β -CD) and hydroxypropyl- β -cyclodextrin (HP- β -CD) were obtained from Fluka® (Saint Louis, USA) and Roquette® (Lestrem, France), respectively.

Equipment and Software

The spectrophotometric analysis was performed on a microcomputer-controlled SHIMADZU UV-1601PC using 10 mm quartz cells. The acquisition of absorbance was carried out between 200-290 nm using the UVPC program. The data were pretreated in Excel[®] (Redmond, USA). A multivariate calibration using the PLS method, CCD and RSM were performed on the Minitab[®] 14 software (State College, USA).

Chromatographic analyses were performed on a liquid chromatography AGILENT Series 1200 controlled by the Agilent ChemStation[®] software (Santa Clara, USA). The chromatographic conditions used for purification and quantification of citral isomers were: mobile phase acetonitrile: water: methanol (47: 43: 10), Ace[®] (Edison, USA) RP18 column (250 mm X 4 mm, 5 μ m), flow rate of 1.4 mL.min⁻¹, injection volume of 15 μ L, detection at 240 nm, and oven temperature set at 30 °C.

Purification and quantification of citral isomers

Neral and geranial were purified injecting samples of citral with an approximate concentration of 1.50 mg.mL⁻¹ in a liquid chromatography (conditions described above). Each isomer was collected individually after detection.

The concentrations of purified isomers were subsequently determined using the same chromatographic system described previously. The standard citral curve in the 50-90 μ g.mL⁻¹ range (23.8-42.8 and 24.8-44.6 μ g.mL⁻¹ for neral and geranial, respectively) was used for quantification of purified isomers.

Multivariate Standard Curve

Mixtures with varying isomer concentrations were prepared by transferring appropriate volumes of neral and geranial to 5 mL volumetric flasks and the volume was completed with a diluent (acetonitrile: water (6:4)). The range of concentrations used for neral and geranial was 0.0 - 8.8 and 0.0 -

7.9 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, respectively (Table 4.1). The absorption spectra were obtained in the range of 200-290 nm in 1 nm increments, using the diluent as a blank. The first order derivative spectra of neral and geranial mixtures were obtained using $\Delta\lambda = 6$ nm without smoothing and the PLS calibration was performed using two main principal components.

Table 4.1. Concentration of citral isomers in different mixtures of the standard calibration.

Mixture	Neral ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	Geranial ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)
M1	4.36	3.95
M2	3.04	2.66
M3	5.96	5.16
M4	5.96	2.70
M5	3.15	5.48
M6	4.49	2.23
M7	2.49	3.96
M8	4.47	5.72
M9	6.77	3.94
M10	5.88	0.00
M11	8.80	0.00
M12	0.00	5.34
M13	0.00	7.91

Optimization of the multivariate calibration

The most relevant range of wavelengths for the multivariate PLS-UV calibration of neral and geranial was found through full factorial experimental design followed by optimization by CCD and RSM.

The factors considered in the full factorial experimental design were low and high wavelength, with five levels for each factor (Table 4.2). Thus, there were twenty-five multivariate PLS calibration models.

Table 4.2. Factors and levels of factorial experimental design.

Factors	Levels
Low wavelength	225, 230, 235, 240, 245 nm
High wavelength	252, 258, 264, 270, 276 nm

The evaluation of the predictive ability of the PLS-UV calibration models generated for each experiment considered the relative standard error of prediction (RSEP) (Eq. 7) [26].

$$RSEP = \frac{100}{\bar{C}} \sqrt{\frac{1}{n} \sum_{i=1}^n (C_i - \hat{C}_i)^2} \quad \text{Equation 7}$$

Where \hat{C}_i is the predicted concentration of sample i ; C_i is the true concentration of sample i ; \bar{C} is the mean of true concentrations and n is the number of samples.

The multivariate calibration by the PLS-UV method was optimized employing CCD and RSM. The CCD used comprises the $2k$ factorial design ($2^2 = 4$) with one center point (1) and star design ($\alpha=1.5$) ($2 \times 2=4$), totaling nine experimental points. The central point was the combination of low and high wavelength with the lowest value of RSEP in the full factorial design. This CCD allows evaluation of linear and quadratic models. RSEP was employed as a response variable.

Multivariate calibration and prediction of test samples

The multivariate PLS-UV calibration was performed employing eleven mixtures with known concentrations of neral and geranial (M3 - M13 in Table 1), two main principal components and cross-validation of the leave-one-out type. The wavelength bands of the first derivative spectra used were 239-271 nm.

The accuracy of optimized PLS-UV was evaluated by determining the recovery of neral and geranial in seven mixtures. The concentrations of neral

and geranial in samples of β -CD-citral and HP- β -CD-citral were determined using the PLS-UV calibration model and HPLC-UV. The concentrations of neral and geranial determined by PLS-UV and HPLC-UV were compared using ANOVA.

Preparation of citral-cyclodextrin complexes by spray drying

β -CD was dissolved (11 g) in 110 mL of ethanol and water mixture (2:1, v/v) heated at 55 °C. After that, a solution of citral in ethanol (10%, w/v) was added slowly to the β -CD solution. The mixture was kept under magnetic stirring for 4 h while cooling down to room temperature. The solution was dried in a Mini Spray Dryer (MSD 1.0, LabMaq, Brazil), operating under the conditions described in Table 4.3. For the preparation of HP- β -CD citral complexes, the same preparation and drying conditions were used. The dried powders were packed on amber glass containers and stored on a desiccator. The samples were named β -CD-Citral and HP- β -CD-Citral.

The samples of the citral-cyclodextrin complexes were weighed and diluted with 60% acetonitrile to obtain neral and geranial concentrations within the calibration curve.

Table 4.3. Operating conditions to prepare citral-cyclodextrins complexes using a Mini Spray Drier equipment.

Parameter	Condition
Feed rate	0.3 L.h ⁻¹
Air flow rate	8.3 L.min ⁻¹
Atomizing air pressure	3.9 atm
Inlet temperature	120 °C
Outlet temperature	78 °C/90 °C
Nozzle diameter	1.2 mm

Results and Discussion

Purification and quantification of citral isomers

Figure 4.2.a shows the HPLC chromatogram of citral. Even at a high concentration it has a good resolution between the peaks of neral and geranial. The isomers of citral were successfully purified and solutions with concentrations around 32 and 30 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ were obtained for neral and geranial, respectively (Figure 4.2.b).

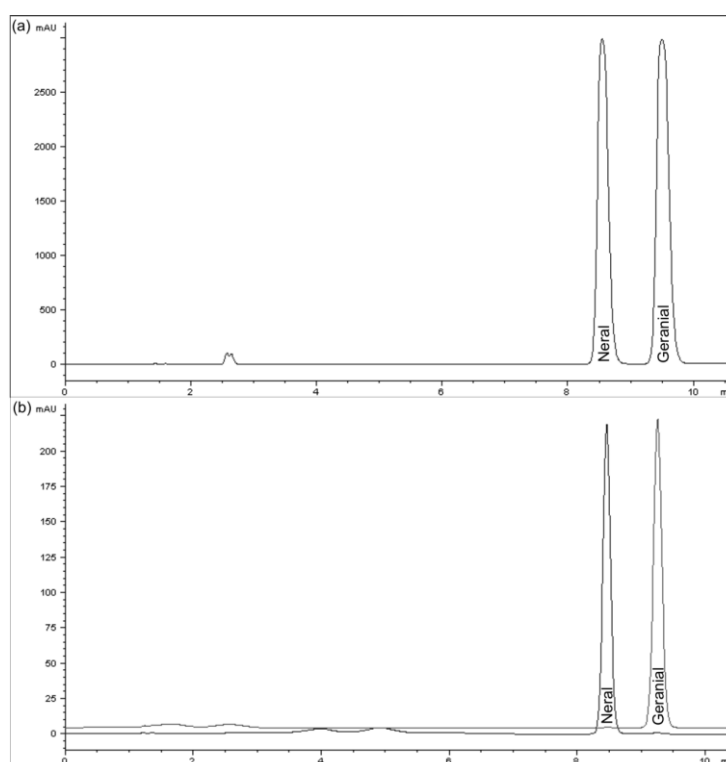


Figure 4.2. (a) Chromatogram of the solution of citral (1.5 mg mL⁻¹). (b) Chromatogram of neral and geranial purified.

Optimization of the multivariate calibration model

The UV absorption spectra of neral and geranial are quite similar, but changes in diluent composition can alter the spectra profile accentuating the difference between the isomers. These differences are essential to apply the PLS method and to obtain good results in the calibration and prediction of samples. Spectra of the isomers were obtained with methanol, acetonitrile and different compositions of aqueous solvents. The difference between the spectra of the isomers was maximized with 60% acetonitrile as a solvent (Figure 4.3.a). The first-order derivatives highlight the differences between the spectra of the

isomers, especially in the 230-270 nm region (Figure 4.3.b). These different UV absorption profiles can be associated with different overlaps of the π orbitals of the geometric isomers. Geranial has a higher maximum absorption wavelength suggesting a greater overlap of the chromophore moiety present in this isomer.

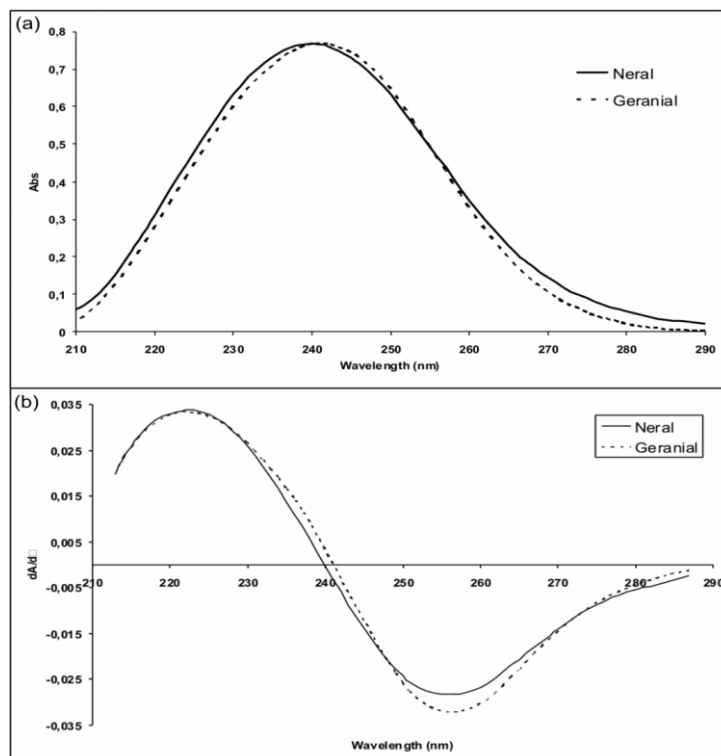


Figure 4.3. (a) UV spectra of neral ($8.8 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) and geranial ($7.9 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) with 60% acetonitrile as diluent. (b) First derivative UV spectra of neral and geranial.

The influence of standard samples (Table 4.1) on the multivariate calibration was previously evaluated. This analysis was performed using two principal components for calibration due to the presence of the two isomers in the samples. The range of wavelengths used was previously selected to minimize the influence of noise, which increases the number of principal components, in order to obtain good predictive results. In general, the noise in the UV spectrophotometry is greater at wavelengths near 200 nm and when the absorptivity of a sample is low. Thus, the selected range was 225-275 nm.

Each mixture was withdrawn once from the calibration and RSEP and F were calculated using ANOVA for regression for neral and geranial. Mixtures with similar concentrations of neral and geranial, especially M1 and M2, negatively influenced the ability of prediction of the PLS model. Mixtures M1

and M2 were removed from the calibration model, increasing the percentage of the model explained by the first principal component, consequently improving prediction accuracy. It was also observed that the pure samples of neral (M10-11) and geranial (M12-13) improved the quality of the predicted results and provided fine-tuning of the model.

The PLS calibrations using the data from the first derivative spectra resulted in smaller values of RSEP and better fittings of the linear regression when compared with the results of zero order data. This result shows that the first derivative increases the difference between the spectra of the isomers and improves the predictive power of the PLS-UV model.

Figure 4.4 presents the results of RSEP obtained with first derivative spectra for the different wavelength bands defined in the full factorial design (5x5). For both isomers, the effects of interactions in all levels were low and, therefore, used to estimate the error. Thus, high and low wavelength (main factors) effects were significant ($p < 0.01$) for both isomers. The best settings for calibration were obtained for the wavelength range of 240-270 nm. The bands of spectra below 230 nm exhibit colinearity among the independent variables, which determines the worst prediction results when used for calibration. Moreover, the high RSEP values obtained at 245 nm show that wavelengths around 240-235 nm are important for setting the PLS-UV model.

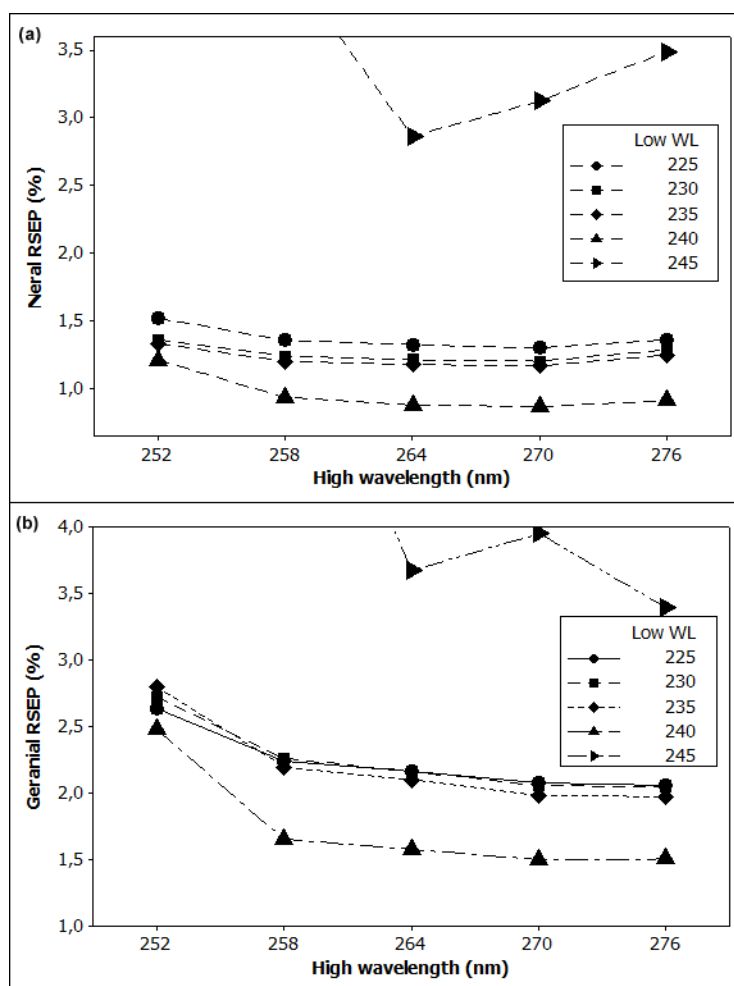


Figure 4.4. RSEP values of the full factorial design for (a) neral and (b) geranial.

CCD and RSM were employed to optimize the PLS calibrations using RSEP as a response. The combination 239-270 nm was used as the central point. A good fit of the quadratic model was obtained and the coefficients of determination (r^2) were 0.915 and 0.893 for neral and geranial, respectively. The shaded area in Figure 4.5 shows the optimum region obtained in the CCD-RSM analysis. It was possible to use the same range of wavelengths in the PLS model for neral and geranial because the lowest values of RSEP for both isomers overlap in the range of 239-271 nm.

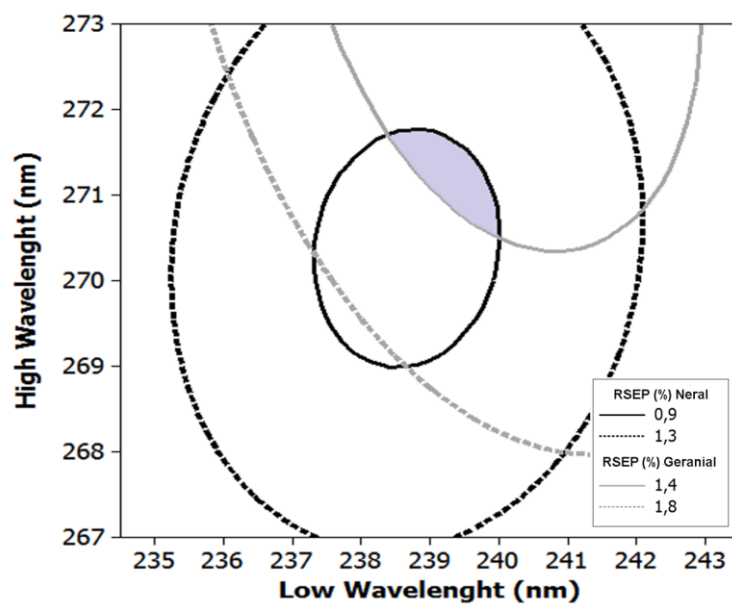


Figure 4.5. Overlaid contour plot of RSEP (%) for neral and geranial obtained in the CCD-RSM analysis.

Multivariate calibration models and prediction of test samples

The number of principal components needed for describing a linear model between absorbance and concentration by PLS must be equal to the number of substances present in the sample. The lowest value of PRESS is used to achieve the optimal number of principal components for a specific PLS model. Two principal components for prediction of neral and geranial were confirmed for the optimized PLS UV model, while for the non-optimized model this number may increase to five, as shown in Figure 4.6. Thus, the optimization and use of two principal components for the PLS-UV model for neral and geranial allowed the exclusion of small principal components that describe noise and have colinearity problems.

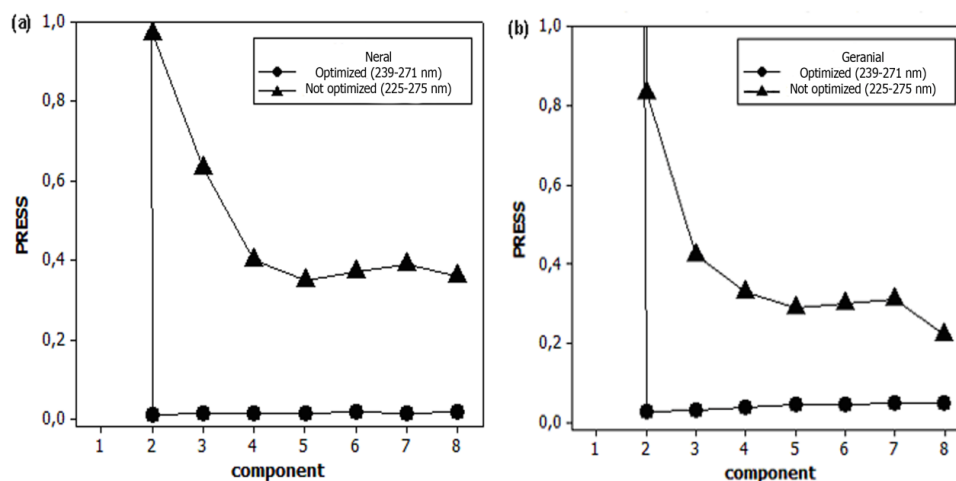


Figure 4.6. Plot of PRESS against the number of components. (a) neral and (b) geranial.

Table 4.4 contains the summarized results of the multivariate calibration. The results are satisfactory and similar to those obtained from simple linear regression.

Table 4.4. Summary of multivariate calibration for neral and geranial obtained by PLS-UV method.

Isomer of Citral	Wavelength interval (nm) ^a	NPC ^b	R ²	PRESS	F (ANOVA)	RSEP (%)
Neral	239-271	2	0.9999	0.0111	29584	0.87
Geranial		2	0.9998	0.0247	15225	1.42

^a wavelength range of first order derivative. ^b NPC – number of principal components.

The predictive ability of the optimized PLS-UV model was evaluated using samples of the citral isomers and complexes of citral with cyclodextrins. Table 4.5 shows the recoveries of seven samples containing various concentrations of neral and geranial. Recoveries close to 100% and low variability demonstrated the ability of the optimized PLS-UV model to determine neral and geranial. The accurate determination of citral isomers was also achieved even in samples containing cyclodextrins as adjuvant. The percentage

of neral and geranial in the samples β -CD-Citral and HP- β -CD-Citral are summarized in Table 4.6. The comparison of results obtained by the PLS-UV and HPLC UV methods showed no significant difference for neral and geranial concentrations in the cyclodextrins complexes ($p > 0.05$ for one-way ANOVA test).

Table 4.5. Recovery of neral and geranial in seven samples using the PLS-UV calibration model optimized by CCD-RSM.

Neral ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)			Geranial ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)		
PLS-UV	Theoretical	Recovery (%)	PLS-UV	Theoretical	Recovery (%)
2.45	2.60	94.2	5.60	5.55	100.9
3.60	3.45	104.4	2.15	2.27	94.7
2.55	2.58	101.2	4.20	4.29	97.9
5.80	6.14	98.8	3.20	3.23	99.1
0.75	0.79	94.9	6.10	6.11	99.8
3.10	3.08	100.6	3.30	3.44	95.9
6.35	6.29	101.0	0.95	1.00	95.0
Mean \pm sd		99.3 \pm 3.62	Mean \pm sd		97.6 \pm 2.45

Moreover, geranial showed higher affinity than neral for both types of cyclodextrins. These results may be associated with the more linear structure of geranial compared to neral, which also explains the greater maximum in the UV spectrum observed for the trans isomer. Higher amounts of the volatile oil were found in samples with β -CD. Hence, β -CD (9.23%) was found to be a better encapsulating agent for citral than HP- β -CD (5.36%).

Table 4.6. Percentage of neral and geranial in the complexes of citral with cyclodextrins determined from the multivariate calibration obtained by PLS-UV method.

	B-CD-Citral		HP- β -CD-Citral	
	Neral (%)	Geranial (%)	Neral (%)	Geranial (%)
Replicate 1	3.62	5.71	2.21	3.29
Replicate 2	3.51	5.39	2.19	3.04
Replicate 3	3.48	5.65	2.09	3.16
Replicate 4	3.64	5.91	2.13	3.33
PLS-UV – Mean \pm sd	3.56 ^a \pm 0.079	5.67 ^a \pm 0.218	2.16 ^a \pm 0.057	3.20 ^a \pm 0.134
HPLC-UV - Mean \pm sd	3.49 \pm 0.047	5.56 \pm 0.092	2.21 \pm 0.025	3.19 \pm 0.037

^a not significant by ANOVA test for $\alpha=0.05$ when compared to HPLC-UV results.

Conclusion

The first UV derivative spectra of mixtures of neral and geranial were successfully used to improve the performance of PLS calibrations and predictions. CCD associated with RSM was able to select the best wavelength range for neral and geranial quantification. Good analytical results demonstrate the usefulness of the PLS-UV calibrations for determination of neral and geranial in samples of citral complexed with cyclodextrins.

References

- [1] Pihlasalo, J.; Klika, K.D.; Murzin, D.Y.; Nieminen, V. Conformational equilibria of citral. *J. Mol. Struct.-THEOCHEM*, 2007, 814, 33-41.
- [2] United Nations Environment Programme. Screening Information Datasets for High Volume Chemicals – Citral. <http://www.chem.unep.ch/irptc/sids/oecdsids/5392-40-5.pdf> (Accessed August 17, 2011).

-
- [3] Onawunmi, G.O.; Yisak, W-A.B.; Ogunlana, E.O. Antibacterial constituents in the essential oil of *Cymbopogon citratus* (DC.) Stapff. *J. Ethnopharmacol.*, 1984, 12, 279-286.
- [4] Wannissorn, B.; Jarikasem, S.; Siriwangechain, T.; Thubthimthed, S. Antibacterial properties of essential oils from Thain medicinal plants. *Fitoterapia*, 2005, 76, 233-236.
- [5] Wannissorn, B.; Jarikasem, S.; Soontorntanasart, T. Antifungal activity of lemon grass and lemon grass oil cream. *Phytother. Res.*, 1996, 10, 551-554.
- [6] Onawunmi, G.O. Evaluation of the antimicrobial activity of citral. *Lett. Appl. Microbiol.*, 1989, 9, 105-108.
- [7] Silva, C.B.; Guterres, S.S.; Weisheimer, V.; Schapoval, E.E.S. Antifungal Activity of the Lemongrass Oil and Citral Against *Candida* spp. *Braz. J. Infect. Dis.*, 2008, 12, 63-66.
- [8] Minami, M.; Kita, M.; Nakaya, T.; Yamamoto, T.; Kuriyama, H.; Imanishi, J. The inhibitory effect of essential oils on Herpes simplex virus type-1 replication in vitro. *Microbiol. Immunol.*, 2003, 47, 681-684.
- [9] Oyedele, A.O.; Gbolade, A.A.; Sosan, M.B.; Adewoyin, F.B.; Soyelu, O.L.; Orafidiya, O.O. Formulation of an effective mosquito-repellent topical product from lemongrass oil. *Phytomedicine*, 2002, 9, 259-262.
- [10] Weisheimer, V.; Miron, D.; Silva, C.B.; Guterres, S.S.; Schapoval, E.E.S. Microparticles containing lemongrass volatile oil: preparation, characterization and thermal stability. *Die Pharmazie*, 2010, 65, 885-890.
- [11] Lockwood, G.B.. Techniques for gas chromatography of volatile terpenoids from a range of matrices. *J. Chromatogr. A*, 2001, 936, 23-31.
- [12] Kim, H.J.; Kim, K.; Kim, N.S.; Lee, D.S. Determination of floral fragrances of *Rosa hybrida* using solid-phase trapping-solvent extraction and gas chromatography–mass spectrometry. *J. Chromatogr. A*, 2000, 902, 389-404.
- [13] Sgorbini, B.; Ruosi, M.R.; Cordero, C.; Liberto, E.; Rubiolo, P.; Bicchi, C. Quantitative determination of some volatile suspected allergens in cosmetic creams spread on skin by direct contact sorptive tape extraction–gas

chromatography–mass spectrometry. *J. Chromatogr. A*, 2010, 1217, 2599-2605.

[14] Brasil. Farmacopeia Brasileira, 5th Ed.; Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA: Brasília, 2010.

[15] Rauber, C.S.; Guterres, S.S.; Schapoval, E.E.S. LC determination of citral in *Cymbopogon citratus* volatile oil. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 2005, 37, 597-601.

[16] Friedman, M.; Henika, P.R.; Levin, C.E.; Mandrell, R.E. Antibacterial Activities of Plant Essential Oils and Their Components against *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella enterica* in Apple Juice. *J. Agric. Food Chem.*, 2004, 52, 6042-6048.

[17] Wang, L.; Asgharnejad, M. Second-derivative UV spectrometric determination of simvastatin in its tablet dosage form. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 2000, 21, 1243-1248.

[18] Özaltın, N.; Koçer, A. Determination of omeprazole in pharmaceuticals by derivative spectroscopy. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 1997, 16, 337-342.

[19] Carlucci, G.; Di Giuseppe, E.; Mazzeo, P. Simultaneous determination of enalapril maleate and hydrochlorothiazide in tablets by derivative UV spectrophotometry and high-performance liquid chromatography. *Int. J. Pharm.*, 1993, 93, 245-248.

[20] Toral, M.I.; Pope, S.; Quintanilla, S.; Richter, P. Simultaneous determination of amiloride and furosemide in pharmaceutical formulations by first digital derivative spectrophotometry. *Int. J. Pharm.*, 2002, 249, 117-126.

[21] Luca, M., Mas, S.; Ioele, G.; Oliverio, F.; Ragno, G.; Tauler, R. Kinetic studies of nitrofurazone photodegradation by multivariate curve resolution applied to UV-spectral data. *Int. J. Pharm.*, 2007, 386, 99-107.

[22] Collado, M.S.; Robles, J.C.; Zan, M.; Cámara, M.S.; Mantovani, V.E.; Goicoechea, H.C. Determination of dexamethasone and two excipients (creatinine and propylparaben) in injections by using UV-spectroscopy and multivariate calibrations. *Int. J. Pharm.*, 2005, 229, 205-2011.

- [23] Ghasemi, J.; Niazi, A. Spectrophotometric determination of nitroaniline isomers by orthogonal signal correction-partial least squares. *Talanta*, 2005, 65, 1168-1173.
- [24] Hemmateenejad, B.; Akhond, M.; Samari, F. A comparative study between PCR and PLS in simultaneous spectrophotometric determination of diphenylamine, aniline, and phenol: Effect of wavelength selection. *Spectrochim Acta A*, 2007, 67, 958-965.
- [25] Niazi, A.; Soufi, A.; Mobarakabadi, M. Genetic algorithm applied to selection of wavelength in partial least squares for simultaneous spectrophotometric determination of nitrophenol isomers. *Anal. Lett.*, 2006, 39, 2359-2372.
- [26] Wiberg, K.; Sterner-Molin, A.; Jacobsson, S.P. Simultaneous determination of albumin and immunoglobulin G with fluorescence spectroscopy and multivariate calibration. *Talanta*, 2004, 62 (3), 567-574.
- [27] Geladi, P.; Kowalski, B.R. Partial least-squares regression: A tutorial. *Anal. Chim. Acta*, 1986, 185, 1-17.
- [28] Zhang, P.; Littlejohn, D. Interference assessment and correction in the partial least squares regression method for multicomponent determination by UV spectrophotometry. *Chem. Intell. Lab. Syst.*, 1996, 34 (2), 203-215.

**5 CAPÍTULO II – AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE E
MECANISMO DE AÇÃO DOS MONOTERPENOS
CONTRA DERMATÓFITOS E LEVEDURAS**

5.1 Introdução

Diversos métodos são empregados para avaliação da atividade antifúngica de substâncias e compostos químicos (macrodiluição, microdiluição, difusão em ágar com discos ou cilindros ou poços, turbidimetria, inibição comparativa, entre outros). Os óleos voláteis vêm extensivamente sendo testados contra diversos tipos de microrganismos (ver Tabela 3.3), contudo, uma revisão sobre os resultados deixa muitas dúvidas quanto à concentração efetiva destes. Devido à grande variabilidade nos resultados obtidos com os diferentes métodos e mesmo dentro de um mesmo método, o National Committee for Clinical and Laboratory Standards (NCCLS) propõe alguns métodos padronizados para determinação da atividade antifúngica.

Neste trabalho, para determinação da concentração inibitória mínima (MIC) foi empregado o método de microdiluição para leveduras (CLSI, 2008a) e fungos filamentosos (CLSI, 2008b) proposto pelo NCCLS que é mundialmente aceito (HAMMER *et al.*, 1998; SERAFIN *et al.*, 2007; SHUKLA *et al.*, 2009; ZORE *et al.*, 2011). Algumas vantagens do teste de microdiluição são: o emprego de menores quantidades de meio de cultura, substâncias em análise e demais reagentes; a atividade não ser dependente da difusão da substância pelo meio; possuir protocolo internacional e resultados mais facilmente reproduzíveis; possibilidade do resultado (avaliação do crescimento) ser realizado de maneira instrumental.

O mecanismo de ação dos monoterpenos como antifúngicos não é esclarecido e métodos microbiológicos para avaliação de dano na parede celular e de afinidade com ergosterol são empregados para este fim. A compreensão do mecanismo de ação favorece os estudos de otimização das moléculas e muitas vezes da relação estrutura atividade. Assim, a determinação do mecanismo de ação dos monoterpenos é um importante passo para potencialização dos efeitos desta classe de agentes antifúngicos.

5.2 Avaliação da Atividade Antifúngica de Complexos de Citral com Ciclodextrinas

As ciclodextrinas (CD) podem ser obtidas a partir do amido através da ação de enzimas específicas para formarem ciclos de 6-8 unidades de dextrina que posteriormente podem ser modificadas dando origem a uma série de produtos viabilizados comercialmente (CEREDA, 2001). As CD são capazes de formar complexos com diferentes fármacos, com diversos objetivos como, por exemplo: aumentar a solubilidade, diminuir a volatilidade, aumentar a biodisponibilidade através do aumento da taxa de dissociação do fármaco, melhorar a estabilidade, reduzir a toxicidade, reduzir irritações locais, modificar o tempo de liberação durante a passagem pelo trato gastrointestinal, mascarar sabores desagradáveis de certos fármacos, vetorização com liberação de fármacos em sítios específicos de ação, prevenir interações fármaco-fármaco e fármaco-adjuvante (RAWAT, JAIN, 2003; IACONINOTO *et al.*, 2004; CHALLA *et al.*, 2005; IWATA *et al.*, 2009; WEISHEIMER *et al.*, 2010).

Visando melhorar a solubilidade e reduzir a instabilidade em meio aquoso do citral foram preparados complexos com ciclodextrinas (β -CD e HP- β -CD). Estudo realizado previamente no LCQFar, por Weisheimer e colaboradores (2010), demonstrou aumento da estabilidade do citral em complexos com CD em comparação com a substância não complexada.

Com o objetivo de verificar a atividade antifúngica dos complexos obtidos foram determinadas as Concentrações Inibitórias Mínimas (MIC) através do método de microdiluição preconizado pelo documento M38-A do CLSI (conforme descrito a seguir no artigo do Capítulo II). Os complexos foram preparados conforme descrito no artigo do Capítulo I (item *Preparation of citral-cyclodextrin complexes by spray drying*). Foram testados os seguintes isolados clínicos de dermatófitos: *Microsporum gypseum*, *Microsporum canis*, *Trichophyton rubrum*, *Trichophyton mentagrophytes* e *Sporothrix shenckii*. As substâncias e concentrações avaliadas foram: citral padrão (Aldrich® lote S22116) e óleo de *C. citratus* (Ferquímica® lote 169) – 256 a 0,5 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$;

itraconazol, nistatina (Schemicals® com potência declarada de 5552 UI.mg⁻¹), complexos de citral com β -CD e HP- β -CD* – 16 a 0,03 μ g.mL⁻¹.

A Tabela 5.1 apresenta os resultados de suscetibilidade e verifica-se que o citral padrão e o óleo de *C. citratus* foram ativos contra todas as espécies avaliadas. O itraconazol não apresentou atividade nas concentrações testadas, apesar da bula do medicamento (Sporanox®) no bulário da ANVISA apresentar, entre outras, indicação contra dermatófitos (ANVISA, 2013). É pertinente ressaltar que o mesmo medicamento, no mercado norte americano, é indicado somente para o tratamento de infecções causadas por espécies de *blastomicetos* e *aspergillus* (RXLIST, 2013). A nistatina é um antifúngico poliênico potente que apresentou atividade contra alguns dos dermatófitos avaliados, apesar de sua indicação, como medicamento, ser para tratamento tópico de candidíase. Embora tenha se verificado atividade do citral em concentrações inferiores a 16 μ g.mL⁻¹, seus complexos com CD não apresentaram efeito antifúngico em concentrações similares. Isto indica que o citral não foi liberado dos complexos em quantidade suficiente para causar a inibição dos fungos testados. Esta afirmação encontra respaldo no trabalho de Ruktanonchai e colaboradores (2011) que relatam a baixa velocidade de liberação do citral do complexo com β -ciclodextrina em meio aquoso (menos de 20% em 6 dias).

Tabela 5.1. Suscetibilidade de fungos aos complexos de citral-ciclodextrinas, óleos voláteis e antifúngicos.

Fungo	MIC (μ g/mL)				Itraconazol	Nistatina
	Citral Padrão	óleo C. citratus	Citral- β -CD	Citral-HP- β -CD		
<i>Microsporum gypseum</i>	4	8	>16	>16	>16	2
<i>Microsporum canis</i>	8	8	>16	>16	>16	>16
<i>Trichophyton rubrum</i>	16	8	>16	>16	>16	8
<i>Trichophyton mentagrophytes</i>	256	128	>16	>16	>16	>16
<i>Sporothrix shenckii</i>	16	2	>16	>16	>16	16

* Os complexos foram adicionados em concentrações suficientes para se obter concentrações de citral na faixa de 16 a 0,03 μ g.mL⁻¹.

Os resultados confirmaram a viabilidade do método de microdiluição em determinar, *in vitro*, a atividade antifúngica do citral e do óleo de *C. citratus*. Contudo, os complexos demonstraram-se incapazes de manter este efeito. Desta forma, a estratégia de viabilizar o citral como antifúngico através de complexos com ciclodextrinas foi abandonada.

5.3 Artigo

O geraniol, quimicamente, é muito similar aos isômeros do citral e, também, possui atividade contra dermatófitos (GONÇALVES *et al.*, 2010; ZORE *et al.*, 2010; AIEMSAARD *et al.*, 2011; KHAN AND AHMAD 2011; NGAN *et al.*, 2012). Devido a grande instabilidade química do citral e dificuldade em preparar formulações estáveis, os isômeros geraniol e nerol foram testados nos ensaios microbiológicos.

A seguir encontra-se artigo que será submetido ao periódico *Journal of Ethnopharmacology*. Este artigo descreve a comparação da atividade antifúngica de monoterpenos (citral, geranial, neral, geraniol e nerol) contra diferentes espécies de leveduras e dermatófitos. Além disso, é investigado o mecanismo de ação dos monoterpenos avaliados.

ANTIFUNGAL ACTIVITY AND MECHANISM OF ACTION OF MONOTERPENES AGAINST DERMATOPHYTES AND YEASTS

Abstract

The antifungal activity of monoterpenes (geraniol, nerol, citral and its isomers – neral and geranial) and control drugs (miconazole, terbinafine and anidulafungin) against seven opportunistic pathogen yeasts and four dermatophytes species was evaluated by the CLSI microdilution tests. The monoterpenes had lower MIC values for dermatophytes than yeasts. *T. rubrum* was the most sensitive microorganism to monoterpenes. Citral and geraniol were the monoterpenes with the best activity against dermatophytes. Neral and

geranial showed synergism in 19 of the 35 strains tested. The *trans* isomers showed higher antifungal activity than the *cis*, probably due to their more linear structure. The mechanism of action was investigated evaluating the damage in the fungal cell wall (Sorbitol Protection Assay) and in cell membrane (Affinity Ergosterol Assay). The monoterpenes showed increased MIC values in the presence of ergosterol and the mechanism of action by structural modification and alteration of thermodynamic properties of the cell membrane was proposed.

Key Words: synergism, dermatophytes, citral, geraniol, nerol, anidulafungin, amphotericin B, miconazole

Introduction

Human mycoses are caused by primary pathogenic fungi that can invade the tissues of a normal host, or by opportunistic fungi that invade the tissues of individuals with severe alterations of the immune system. Dermatophytosis is one of the most frequent dermal lesions that affect humans and animals, and are often caused by dermatophytes of the genera *Epidermophyton*, *Microsporum* and *Trichophyton*. These fungi infect keratinized tissue as skin, nails and scalp and its lesions are characterized by irritation, scaling, local redness, swelling and inflammation (Gupta and Cooper, 2008; Kyle and Dahl, 2004; Patel and Schwartz, 2011). On the other hand, some dermatophytoses may be associated with the presence of opportunistic yeast pathogens, among them the genus *Candida* that can quickly colonize damaged nail or skin, especially the mucous membranes.

Citral (CIT), geraniol (GOL) and nerol (NOL) are considered monoterpenes and volatile oils. CIT is a mixture of two geometric isomers, neral (NAL - *cis isomer*) and geranial (GAL – *trans isomer*), and commercially, the proportions of the isomers are almost identical, around 50% for each isomer (Weisheimer *et al.*, 2010).

The diversity of medicinal plants contributes to several studies that aim to demonstrate the action and effectiveness of some compounds against fungi. It is worth noting that volatile oils containing CIT, GOL and NOL, have proved

promising, and may be incorporated into pharmaceutical preparations, alone or in combination (Prasad et al., 2010; Saddiq and Khayyat, 2010; Zore et al., 2011).

The mechanism of action of these substances has not been completely clarified. Some studies showed the breakdown of cytoplasmic and organelle membranes exposed to certain volatile oils. The loss of membrane integrity can cause changes in membrane function leading to the antifungal activity (Park et al., 2009; Pinto et al., 2006; Sikkema et al., 1995). Despite these findings, it is not known how the volatile oils cause membrane damage. The discovery of the mechanism of action can help to maximize the effect of natural products, either by concentration of active ingredients or formulation optimization.

Considering the significance of dermatomycosis and candidiasis as prevalent diseases (Caputo et al., 2001; Ghannoum et al., 2000), the present study was undertaken to establish the antifungal activity of some monoterpenes found in volatile oils – GOL, NOL, GAL, NAL and CIT – and investigates possible mechanisms of action for these substances.

Material and Methods

Antifungal Agents and Growth Media

Citral (97%), geraniol (99%), nerol (99%) and ergosterol were purchased from Sigma-Aldrich® (Brazil). Miconazole (100,0%) was supplied by Brazilian Pharmacopoeia. Anidulafungin (Ecalta®) was purchased from Pfizer® and each 1.0 g of injectable product contains 100 mg of anidulafungin. Terbinafine hydrochloride (100,0%) and amphotericin B (972 µg.mg⁻¹) were kindly supplied by Cristália® (Brazil). Methanol (Tedia®, HPLC grade) and water filtered through a Milli-Q purification system (Millipore®) were used for HPLC mobile phase preparation. RPMI 1640 medium containing L-glutamine and without sodium bicarbonate - Sigma-Aldrich Co., St Louis, MO, USA - buffered to pH 7.0 with MOPS buffer (Sigma®).

Isolates

The set of isolates included yeasts: *C. albicans*, *C. krusei*, *C. glabrata*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, *Cryptococcus neoformans*, *T. asahii*, and dermatophytes: *T. rubrum*, *T. mentagrophytes*, *M. canis* and *M. gypseum*, from the culture collections of the Laboratory of Applied Mycological Research - Federal University of Rio Grande do Sul.

Inoculum preparation

Inoculums were prepared according to M27-A3 and M38-A2 documents determined by the Clinical Laboratory and Standards Institute (CLSI, 2008a, b). Briefly, stock filamentous fungi inoculum suspensions were prepared from 7-day cultures grown on potato dextrose agar (Oxoid) and adjusted in sterile saline 0.9% spectrophotometrically to optical densities that ranged from 0.085 to 0.100 (approximately 80 to 82% transmittance) and diluted (1:50) in RPMI 1640 with MOPS buffer (RPMI-MOPS). Yeasts were grown on Sabouraud Dextrose Agar (Oxoid) for 48 h at 35 °C and standardized to the turbidity of a 0.5 McFarland standard and diluted 1:50 in saline followed by dilution 1:20 in RPMI-MOPS.

Microdilution assay

Minimal inhibitory concentration (MIC) values were determined by broth microdilution using the twofold dilution method according to the CLSI guidelines with RPMI-MOPS. Monoterpenes (CIT, GOL and NOL), isomers of citral (GAL and NAL) and antifungal drugs (miconazole (MCZ), terbinafine hydrochloride (TBF), anidulafungin (AFG) and amphotericin B (AMP)) were tested in the range of 0.25 to 128 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$. Afterwards, 100 μL were inoculated into all but the negative control of a flat-bottom 96-well microtiter plate with a range of each drug concentration. The microplates were incubated for 48 h at 35 °C for the yeast fungi and dermatophytes were incubated for seven days at the same temperature. All assays were tested in triplicate. The MIC was defined as the lowest concentration of compounds at which the microorganism tested did not demonstrate visible growth.

Minimal Fungicidal Concentration

The minimal fungicidal concentration (MFC) was determined by sub-culturing volumes of 10 μl from wells without visible growth in SDA with Cloranfenicol (Difco, Detroit, USA) and incubated at 35 °C for 48 h for the yeast fungi and for 7 days for dermatophytes. Minimum fungicidal concentration (MFC) was defined as the lowest concentration yielding negative subcultures.

Mechanism of action

Sorbitol protection assay: MIC values were determined using *T. assahii* TAH10, by the standard broth microdilution procedure described above. Duplicate plates were prepared: one of them containing two-fold dilutions of AFG (positive control), CIT, GOL or NOL from 1 to 256 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ and the other one, containing the same concentrations plus 0.8 mol.L^{-1} sorbitol. MICs were determined at 2 and 7 days.

Ergosterol Effect Assay: MIC of AMP (positive control), CIT, GOL or NOL against *T. assahii* TAH10 was determined following the guidelines of CLSI as explained above, in the absence and in the presence of different (50–250 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) concentrations of ergosterol added to the assay medium, in different lines of the same microplate. MIC was determined at 24 h according to the control fungus growth and confirmed after 48 h.

Purification of Citral Isomers

Citral isomers (GAL and NAL) were obtained from citral solution (10 mg.mL^{-1}) purified by High-performance liquid chromatography (HPLC). Purification was performed in an Agilent instrument (serie 1200) using a reversed phase ACE[®] RP18 column (250mm x 4 mm, 5 μm particle size). The system was set with mobile phase consisting of methanol and water (67:33, v/v), injection volume 50 μL , and flow rate 1.4 mL.min^{-1} . The citral isomers were monitored with detection at 254 nm and the apex peak of each isomer was collected separately in glass tubes. The purified isomers were subsequently quantified with the same HPLC method (detection at 240 nm). NAL and GAL

obtained by purification were diluted with water to a concentration of 256 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. Thus, the initial concentrations of GAL and NAL in the microdilution test were 128 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ with less than 7% methanol.

Statistical analysis

Statistical analysis was carried out with the Prism 5 for Windows (GraphPad software®). MIC data were employed to compare the activity of the antifungal agents by Friedman Test ($\alpha = 0.05$).

Results and Discussion

Antifungal Activity and Synergism

Yeasts isolates tested in this study exhibited differential sensitivity towards volatile oils and antifungal drugs (Table 5.2). CIT was more active against *C. neoformans* and *T. asahii*. Furthermore, CIT showed lower MIC against *Candida* species than its isolated isomers. The median MIC results of GOL and NOL against yeasts were not impressive, especially for *Candida* species. It should be mentioned that all yeast strains were susceptible to CIT in the concentration range evaluated (0.25 - 128 $\mu\text{g.mL}^{-1}$). AFG, MCZ and TBF were employed as control and only MCZ has good results for *C. neofarmans*.

For isolates of dermatophytes, the monoterpenes have their main activity against *T. rubrum* which in turn is most responsible for onychomycosis (Nazar et al., 2012; Thomas et al., 2010). *Microsporum* species infect animals more than humans, but reports demonstrate that dogs and cats can be involved in transmitting these microorganisms to man (Grills et al., 2007; Segundo et al., 2004). CIT was the most active monoterpene against *Microsporum* strains. AFG, in most of the dermatophyte strains, had no activity and its greatest activity could be achieved only for yeasts. TBF was the only control that showed activity against all the dermatophyte strains tested.

For more than 90% of the strains tested, MFC was two to four times greater than the MIC for yeasts and equal to or twice the dermatophytes. These

results confirm the fungicidal effect of monoterpenes and suggest that they are more effective against dermatophytes.

Figure 5.1 summarizes the effects of different substances against dermatophytes and yeasts. The AFG and MCZ were the most active antifungals against yeasts. Citral was the only monoterpene in which MIC did not differ statistically from AFG and MCZ. CIT was active at the concentrations tested against all strains of yeast and dermatophytes.

MCZ and TBF showed low values of MIC for the dermatophytes tested. The monoterpenes were more active against dermatophytes than yeasts. Again, CIT was not statistically different when compared to the antifungal controls (MCZ and TBF in this case). GOL and GAL had intermediate activity, similar to CIT in many strains. Furthermore, we found that the *trans* isomers (GOL and GAL) were more active than *cis* (NOL and GOL). The better activity of *trans* isomers can be related to their structures that are more linear than those observed for *cis* isomers (Rungsardthong Ruktanonchai et al., 2011; Weisheimer et al., 2010). This conformational property makes the transport of *trans* isomers across the cell wall easier and can lead to higher concentrations in cellular membrane and inside the cell.

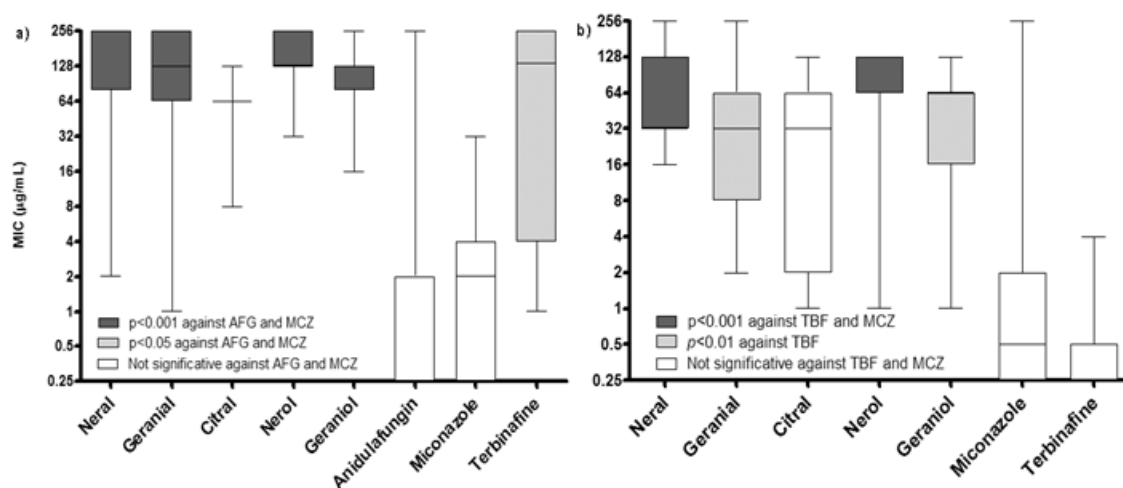


Figure 5.1. MIC Box plot of monoterpenes and antifungals against (a) yeast and (b) dermatophytes. Substances were compared using the Friedman test (nonparametric test for paired/matched data and Dunn's post test to compare all substances). When the substance showed MIC > 128 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, MIC = 256 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ was used for statistical purposes.

Table 5.2. Susceptibility of Yeast and Dermatophytes against monoterpenes and antifungal drugs. Median MIC in $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ (the results in brackets represent the maximum and minimum MIC for each specie).

	<i>Dermatophytes</i>				<i>Yeasts</i>						
	<i>T. rubrum</i> (n=5)	<i>T. mentha</i> ^a (n=3)	<i>M. canis</i> (n=4)	<i>M. gypseum</i> (n=3)	<i>C. albicans</i> (n=3)	<i>C. Krusei</i> (n=3)	<i>C. glabrata</i> (n=3)	<i>C. tropicalis</i> (n=3)	<i>C. parapsilosis</i> (n=3)	<i>T. assahii</i> (n=3)	<i>C. neoformans</i> ^b (n=2)
NAL	32 (128,16)	128 (128,16)	80 (>128,32)	>128 (>128,32)	>128 (>128,>128)	>128 (>128,>128)	64 (>128,32)	>128 (>128,>128)	>128 (>128,128)	128 (>128,64)	17 (32,2)
GAL	8 (128,2)	32 (64,8)	48 (128,16)	32 (>128,16)	>128 (>128,>128)	>128 (>128,64)	64 (64,64)	>128 (>128,128)	64 (>128,32)	128 (128,64)	8.5 (16,1)
CIT	4 (64,2)	32 (128,2)	48 (64,16)	16 (128,1)	64 (128,64)	64 (64,64)	64 (128,64)	64 (128,64)	64 (128,64)	32 (64,32)	12 (16,8)
NOL	64 (64,32)	128 (128,64)	128 (128,128)	128 (128,1)	>128 (>128,128)	128 (128,128)	>128 (>128,128)	>128 (>128,128)	128 (128,64)	64 (128,32)	128 (128,128)
GOL	64 (64,2)	32 (64,32)	40 (64,1)	128 (128,1)	>128 (>128,128)	128 (128,64)	>128 (128,32)	128 (128,128)	128 (128,64)	128 (128,32)	72 (128,16)
AFG	>128 (>128,4)	>128 (>128,4)	>128 (>128,4)	>128 (>128,1)	<0.3 (<0.3,<0.3)	<0.3 (<0.3,<0.3)	<0.3 (<0.3,<0.3)	0.5 (2,<0.3)	2 (2,<0.3)	4 (>128,1)	128 (>128,0.5)
MCZ	0.5 (0.5,<0.3)	<0.3 (2,<0.3)	0.5 (32,<0.3)	4 (>128,0.5)	8 (8,<0.3)	0.5 (32,<0.3)	0.5 (4,<0.3)	4 (32,2)	2 (2,<0.3)	<0.3 (4,<0.3)	1.1 (2,<0.3)
TBF	<0.3 (<0.3,<0.3)	2 (4,<0.3)	0.5 (4,<0.3)	<0.3 (0.5,<0.3)	>128 (>128,1)	>128 (>128,8)	>128 (>128,16)	>128 (>128,>128)	1 (4,1)	4 (8-1)	130 (>128,4)

^a *T. menthagrophytes*; ^b *C. neoformans*.

These results clearly demonstrate that the monoterpenes are more toxic to dermatophytes than to yeasts. CIT was the most active monoterpene and there are indications of synergism among its isomers. Since CIT is composed of two isomers and these were evaluated individually, the fractional inhibitory concentration index (FICI) can be calculated by equation 1.

$$FICI = \frac{\frac{1}{2}MIC_{CIT}}{MIC_{NAL}} + \frac{\frac{1}{2}MIC_{CIT}}{MIC_{GAL}} \quad Eq. 1$$

CIT had showed MIC lower or equal to $128 \mu\text{g.mL}^{-1}$ for all strains tested in this study. For this reason, when NAL or GAL had MIC higher than $128 \mu\text{g.mL}^{-1}$, $256 \mu\text{g.mL}^{-1}$ were used with no risk of underestimating FICI.

Figure 5.2 shows counting the FICI results for the 35 strains tested in this study. Synergism could be defined as $FICI \leq 0.5$. Indifference was defined as $0.5 < FICI \leq 4$, whereas antagonism was defined when $FICI > 4$ (Mukherjee et al., 2005). For most strains (55%) synergism was found between isomers of citral. Furthermore, in no case antagonism was observed. Thus, a mixture of monoterpenes may be an alternative for improving antifungal activity. Indeed, a synergistic effect can be expected for oils extracted from plants, because these are mixtures of different compounds.

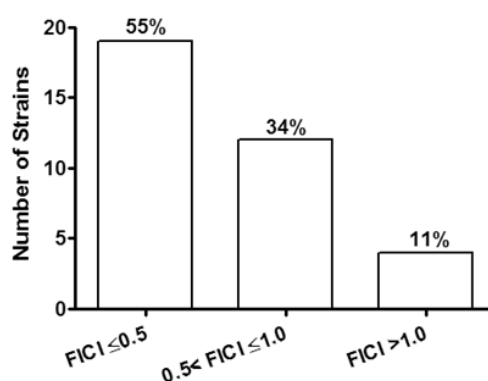


FIGURE 5.2. Synergism evaluation among CIT isomers. $FICI \leq 0.5$ indicates synergism.

Finally, the volatile oils are studied for a long time due to their antimicrobial properties. Among the volatile oil extracts with antifungal activity

are highlighted those containing CIT and GOL. In this study we are not able to differentiate these substances statistically by their antifungal effect, especially for dermatophytes. However citral showed the largest spectrum among the compounds, in accordance with reports that usually had better results for extracts containing CIT. GOL also had great results, even better than CIT in some cases.

Mechanism of action

The Sorbitol Protection Assay (Frost et al., 1995) was performed to test the effect of monoterpenes on the integrity of the fungal cell wall. In this assay, MIC determinations were conducted with and without 0.8 mol.L⁻¹ sorbitol. It is expected that the MIC of a compound that damages the cell wall will shift to a much higher value in the presence of the osmotic support, because sorbitol is an osmotic protectant used for stabilizing fungal protoplasts. *T. assahii* was the microorganism test and AFG the positive control.

The positive control had MIC increased by the presence of sorbitol (Table 5.2). However, after seven days of incubation, there was no increasing on the MIC of monoterpenes. This suggests that CIT, GOL and NOL would not act by inhibiting the mechanisms of controlling cell wall synthesis or assembly. In addition, morphological analysis of the microorganism not treated with any antifungal showed perfect yeast cells in reproduction (Figure 5.3). Cells treated with AFG and sorbitol, after seven days, are viable and recover their growth, but dysmorphic cells still occur due to damage to the wall cell.

Table 5.2. MIC values ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) of monoterpenes and anidulafungin against *T. assahii* TAH10 in the Sorbitol Protection Assay.

Drug	No sorbitol		Sorbitol 0.8 mol.L ⁻¹	
	Day 2	Day 7	Day 2	Day 7
AFG (control)	1	1	1	128
CIT, GOL and NOL	32	32	32	32

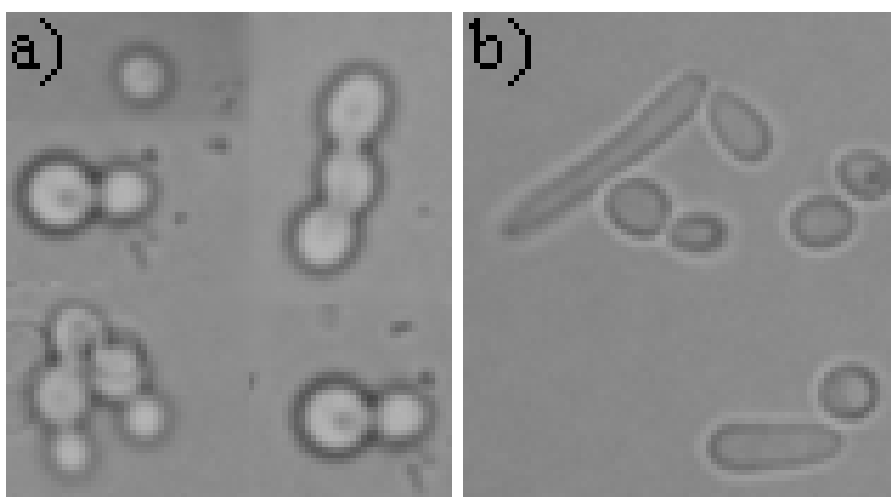


Figure 5.3. Optical microscopy of *T. assahii* after 7 days of incubation in culture medium (a) no antifungal, (b) medium with AFG and sorbitol.

To determine if monoterpenes damage the fungal membrane, the assay based on the effect of exogenous ergosterol was performed. This test detects if a compound binds to ergosterol. The affinity of a molecule to ergosterol can be established by determining the MIC in the presence of exogenous ergosterol in the extracellular media. If the compound has affinity to ergosterol, it will rapidly form a complex, preventing the cellular membrane from interacting with ergosterol. Consequently the observed MIC is increased. Amphotericin B is used as a positive control in this test and increasing MIC confirms that the compound interacts with ergosterol.

In our study we employed *T. assahii* in the “Affinity Ergosterol Assay”, because a specific isolate strain showed the same MIC for CIT, GOL e NOL ($32 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$). Amphotericin B (AMP) had a MIC of $0.125 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ for this same strain. All substances had their MIC increased since larger amounts of exogenous ergosterol were added to medium (Figure 5.4). When $200 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ of ergosterol was in the medium MIC for monoterpenes had increased five-fold ($\text{MIC} = 160 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$). There was an affinity of AMP to ergosterol and in $200 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ of ergosterol there was no more inhibition of AMP. This is probably due to the low concentrations of AMP and the large relative concentration of ergosterol.

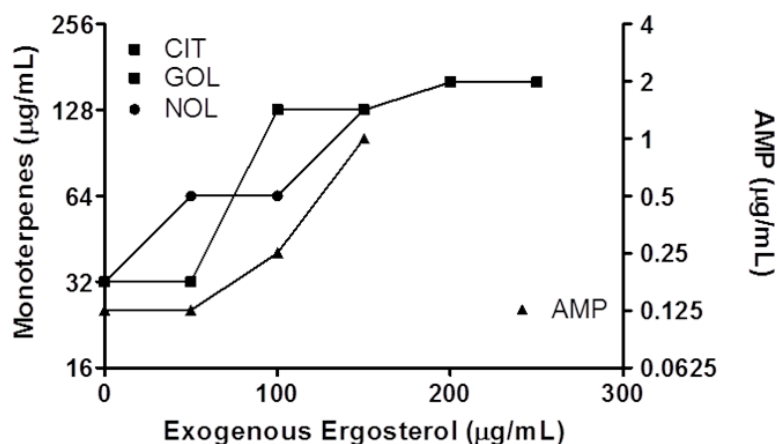


Figure 5.4. Effect of exogen ergosterol (50–250 µg.mL⁻¹) on the MIC of monoterpenes (CIT, GOL and NOL) and amphotericin B (AMP) against *T. assahii* TAH10.

The mechanism of action of AMP is associated with effects on the fungal cell membrane through interaction with ergosterol. The specific interaction of AMP with ergosterol determines the formation of pores in the membrane that leads to changes in cell permeability and fungicidal effect, since it allows the output of intracellular metabolites and ions essential for cell survival. Inside the cell, AMP can act as a pro-oxidant and induce the accumulation of reactive oxygen species. However, it is possible that this effect requires prior interaction with intracellular ergosterol. Because reactive oxygen species are the products of the respiratory chain, one can not rule out the influence of AMP on mitochondrial activity. The accumulation of free radicals has a deleterious effect on essential components such as membrane proteins, DNA and mitochondria leading to cell death (Mesa-Arango et al., 2012).

Park *et al.* (2009) reported the effect of citral at the cellular level in strain of *T. menthagrophytes* employing the Scanning Electron Microscopy (SEM) and Transmission Electron Microscopy (TEM) techniques. The authors found reduced thickness and the presence of discontinuities in the cellular membrane, concluding that the membrane was degraded. The results with high concentrations of terpenes (citral, eugenol, nerolidol and α -pinene) also show

the breakdown of the cell membrane and, moreover, the abnormal structure of mitochondria.

The positive results on the “Affinity Ergosterol Assay” and the other reports on the subject lead us to postulate that the mechanism of action of the monoterpenes tested (CIT, GOL and NOL) is related to the destabilization of the cell membranes by interaction with ergosterol. Since the formation of pores in the cell membrane was not investigated, it can only be said that monoterpenes may act by modifying structural and thermodynamic properties of the lipid bilayer.

Conclusion

A serie of monoterpenes including CIT, NAL, GAL, NOL and GOL were evaluated for their antifungal activity with CLSI reference assays against 11 species of pathogenic fungi. Based on MIC results it was verified that monoterpenes are more active against dermatophytes than yeasts. CIT and GOL were the most active monoterpenes against dermatophytes. The *trans* isomers had a lower MIC than the *cis*. Synergism among NAL and GAL was established in over half of the strains tested. The monoterpenes showed affinity for ergosterol relating their activity to cell membrane damage.

Acknowledgements

The authors wish to thank to CNPq (Brazil) by the financial support and Cristalia® (Brazil) for the kind provision of terbinafine and amphotericin B.

References

Caputo, R., De Boule, K., Del Rosso, J., Nowicki, R., 2001. Prevalence of superficial fungal infections among sports-active individuals: results from the Achilles survey, a review of the literature. *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology* : JEADV 15, 312-316.

CLSI, 2008a. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of filamentous fungi : approved standard, 2nd ed. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA.

- CLSI, 2008b. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts : third informational supplement. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA.
- Frost, D.J., Brandt, K.D., Cugier, D., Goldman, R., 1995. A whole-cell *Candida albicans* assay for the detection of inhibitors towards fungal cell wall synthesis and assembly. *The Journal of antibiotics* 48, 306-310.
- Ghannoum, M.A., Hajjeh, R.A., Scher, R., Konnikov, N., Gupta, A.K., Summerbell, R., Sullivan, S., Daniel, R., Krusinski, P., Fleckman, P., Rich, P., Odom, R., Aly, R., Pariser, D., Zaiac, M., Rebell, G., Leshner, J., Gerlach, B., Ponce-De-Leon, G.F., Ghannoum, A., Warner, J., Isham, N., Elewski, B., 2000. A large-scale North American study of fungal isolates from nails: the frequency of onychomycosis, fungal distribution, and antifungal susceptibility patterns. *Journal of the American Academy of Dermatology* 43, 641-648.
- Grills, C.E., Bryan, P.L., O'Moore, E., Venning, V.A., 2007. *Microsporum canis*: report of a primary school outbreak. *The Australasian journal of dermatology* 48, 88-90.
- Gupta, A.K., Cooper, E.A., 2008. Update in antifungal therapy of dermatophytosis. *Mycopathologia* 166, 353-367.
- Kyle, A.A., Dahl, M.V., 2004. Topical therapy for fungal infections. *American journal of clinical dermatology* 5, 443-451.
- Mesa-Arango, A.C., Scorzoni, L., Zaragoza, O., 2012. It only takes one to do many jobs: Amphotericin B as antifungal and immunomodulatory drug. *Frontiers in microbiology* 3, 286.
- Mukherjee, P.K., Sheehan, D.J., Hitchcock, C.A., Ghannoum, M.A., 2005. Combination treatment of invasive fungal infections. *Clinical microbiology reviews* 18, 163-194.
- Nazar, J.R., Gerosa, P.E., DIAZ, O.A., 2012. Onychomycosis: epidemiology, causative agents and assessment of diagnostic laboratory methods. *Rev Arg Microb* 44, 21-25.
- Park, M.J., Gwak, K.S., Yang, I., Kim, K.W., Jeung, E.B., Chang, J.W., Choi, I.G., 2009. Effect of citral, eugenol, nerolidol and alpha-terpineol on the ultrastructural changes of *Trichophyton mentagrophytes*. *Fitoterapia* 80, 290-296.
- Patel, G.A., Schwartz, R.A., 2011. *Tinea capitis*: still an unsolved problem? *Mycoses* 54, 183-188.
- Pinto, E., Pina-Vaz, C., Salgueiro, L., Goncalves, M.J., Costa-de-Oliveira, S., Cavaleiro, C., Palmeira, A., Rodrigues, A., Martinez-de-Oliveira, J., 2006. Antifungal activity of the essential oil of *Thymus pulegioides* on *Candida*, *Aspergillus* and dermatophyte species. *Journal of medical microbiology* 55, 1367-1373.
- Prasad, C.S., Shukla, R., Kumar, A., Dubey, N.K., 2010. In vitro and in vivo antifungal activity of essential oils of *Cymbopogon martini* and *Chenopodium ambrosioides* and their synergism against dermatophytes. *Mycoses* 53, 123-129.

Rungsardthong Ruktanonchai, U., Srinuanchai, W., Saesoo, S., Sramala, I., Puttipipatkachorn, S., Soottitantawat, A., 2011. Encapsulation of citral isomers in extracted lemongrass oil with cyclodextrins: molecular modeling and physicochemical characterizations. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry* 75, 2340-2345.

Saddiq, A.A., Khayyat, S.A., 2010. Chemical and antimicrobial studies of monoterpene: Citral. *Pesticide Biochemistry and Physiology* 98, 5.

Segundo, C., Martinez, A., Arenas, R., Fernandez, R., Cervantes, R.A., 2004. [Superficial infections caused by *Microsporum canis* in humans and animals]. *Revista iberoamericana de micología* 21, 39-41.

Sikkema, J., de Bont, J.A., Poolman, B., 1995. Mechanisms of membrane toxicity of hydrocarbons. *Microbiological reviews* 59, 201-222.

Thomas, J., Jacobson, G.A., Narkowicz, C.K., Peterson, G.M., Burnet, H., Sharpe, C., 2010. Toenail onychomycosis: an important global disease burden. *Journal of clinical pharmacy and therapeutics* 35, 497-519.

Weisheimer, V., Miron, D., Silva, C.B., Guterres, S.S., Schapoval, E.E., 2010. Microparticles containing lemongrass volatile oil: preparation, characterization and thermal stability. *Pharmazie* 65, 885-890.

Zore, G.B., Thakre, A.D., Rathod, V., Karuppayil, S.M., 2011. Evaluation of anti-*Candida* potential of geranium oil constituents against clinical isolates of *Candida albicans* differentially sensitive to fluconazole: inhibition of growth, dimorphism and sensitization. *Mycoses* 54, e99-109.

**6 CAPÍTULO III – VALIDAÇÃO DE MÉTODO ANALÍTICO
E ESTABILIDADE DOS ISÔMEROS DO CITRAL**

6.1 Introdução

O método comumente empregado para análise de óleos voláteis é a Cromatografia Gasosa (CG) com detecção por Ionização de Chama (DIC) ou Massas (MS). O Índice de Kovats associado ao tempo de retenção é utilizado para identificação dos componentes dos óleos voláteis, bem como os espectros de massa dos picos cromatográficos (BRASIL, 2010; BASSOLÉ et al., 2011; OMAR et al., 2011;).

Alterações estruturais de substâncias termolábeis geralmente são negligenciadas, porém podem ocorrer devido à alta temperatura do injetor na CG ou por catálise de superfícies ativas das colunas cromatográficas. Além disso, a análise por CG em produtos com matriz contendo água, como cremes, pode ser problemática requerendo várias etapas de processamento (TUREK & STINTZING, 2011).

A análise de óleos voláteis por Cromatografia Líquida (LC) associada à detecção no UV vem ganhando espaço e se mostra como uma alternativa à técnica de CG. Os tempos de retenção associados aos espectros de UV são empregados para identificação dos componentes dos óleos voláteis (RAUBER et al., 2005; VILLA et al., 2007; TUREK & STINTZING, 2011).

Apesar do caráter lipofílico dos óleos voláteis, o uso da LC em fase reversa (RP) é facilmente empregado utilizando mistura de solventes orgânicos com água. A mistura dos isômeros do citral empregando RP-LC é obtida com tempos de análise inferiores a 10 min (WEISHEIMER, 2008; WEISHEIMER et al., 2010).

A avaliação da estabilidade de substâncias ativas é altamente especializada e complexa por natureza. Esta avaliação em diferentes condições favorece a preparação de formulações e, também, a definição de cuidados que devem ser tomados durante o manuseio e armazenagem (CARSTENSEN; RHODES, 2000).

Isômeros geométricos podem se interconverter através de reações reversíveis chamadas *isomerização cis-trans*. Estas envolvem rotação de 180° sobre a liga dupla C=C (Figura 6.1) e comumente são ativadas por calor e luz

(ALBINI, FASANI, 1998; SALTIEL, SUN, 2003). Em soluções aquosas o pH também pode exercer influencia na velocidade de conversão cis-trans (SHOJI *et al.*, 2007).

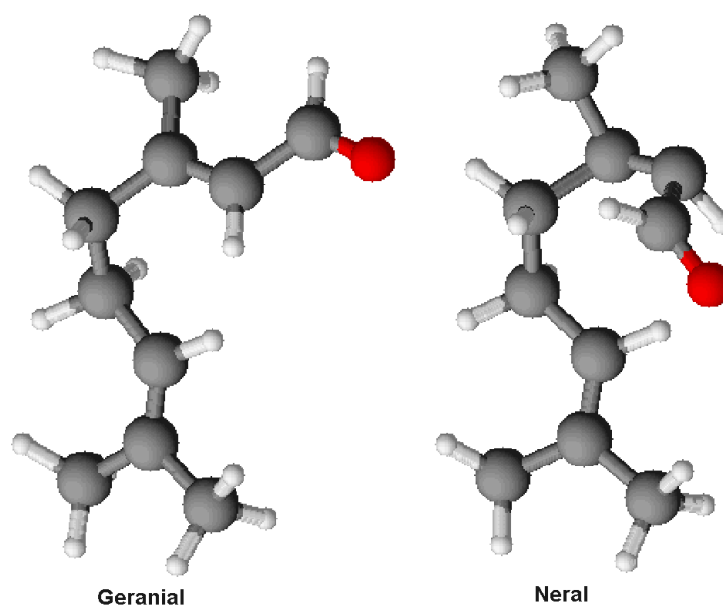


Figura 6.1. Isômeros do citral e a rotação de 180° em torno da liga dupla.

Estudos demonstram que formulações contendo citral são suscetíveis a perda de teor por volatilidade (SILVA, 2005; WEISHEIMER, 2008) e degradação em meio ácido (KIMURA *et al.*, 1983; UENO *et al.*, 2004; CHOI *et al.*, 2009).

O objetivo deste estudo foi validar método analítico por LC-UV para determinação da estabilidade dos isômeros do citral em soluções tamponadas com diferentes pH e presença e dispersão por meio de creme ao qual o citral foi incorporado como fase oleosa.

6.2 Materiais e Métodos

Reagentes

Os reagentes empregados foram: methanol Tedia® (Fairfield, EUA), etanol e acetona Merck® (Darmstadt, Germany) e água ultrapura obtida por sistema de filtração Milli-Q Plus® (Millipore, Bedford, EUA). Citral padrão

adquirido da Aldrich® (Saint Louis, EUA), lot S22116, com pureza determinada de 97,1% (49,5% de geranial e 47,6% de neral).

Condições Cromatográficas

As soluções analisadas por LC-UV foram previamente filtradas com filtro de membrana Milipore® Millex HN Nylon, com abertura de poro nominal de 0,45 µm e corpo de polietileno de 47 mm de diâmetro interno.

Para a realização das análises utilizou-se cromatógrafo a líquido, marca AGILENT, modelo 1200 Series, equipado com bomba de fluxo G1311A, injetor automático G1329A, termostato G1330B, desaerador G1322A, detector de arranjo de diodos G1322A e operado pelo programa Agilent ChemStation®. As condições cromatográficas utilizadas na validação estão resumidas na Tabela 6.1.

Tabela 6.1. Condições cromatográficas utilizadas na validação de método por LC-UV para determinação de citral em solução e em cremes.

Parâmetro	Descrição
Fase móvel (FM)	Metanol: água (70:30)
Vazão	1,2 mL/min
Coluna	ACE® C18 (250 mm X 4 mm, 5 µm)
Deteção	Quantificação em 240 nm.
Temperatura do forno	30 °C
Volume injetado	20 µL
Programa Agilent Chemstation B.02.01	Aquisição, tratamento e apresentação dos resultados

Os seguintes parâmetros de desempenho analítico foram avaliados a fim de garantir os resultados obtidos pelo método de LC-UV para quantificação dos isômeros do citral: especificidade, linearidade, precisão, exatidão e robustez (BRASIL, 2003; ICH, 2005).

Especificidade

A especificidade do método foi avaliada através da verificação da influência do creme base na análise do neral e geranial.

Linearidade

A linearidade foi realizada através da análise da curva padrão obtida a partir dos resultados das áreas dos picos de neral e geranial com concentrações crescentes. Foram utilizadas 5 concentrações crescentes de citral padrão correspondentes à faixa de 10 – 30 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ para cada isômero.

Precisão

A precisão foi determinada através da repetibilidade e da precisão intermediária. A determinação da repetibilidade foi realizada por meio da determinação do DPR de sete amostras do creme contendo citral e a precisão intermediária foi avaliada a partir da determinação do DPR entre os resultados obtidos em dois dias de análise empregando dois analistas. As amostras foram preparadas conforme descrito a seguir. Pesar, individualmente, 350 mg de creme (contendo 3% de citral (p/p)). Adicionar e homogeneizar, sucessivamente, 3 porções de 0,5 mL de água, evitando a formação de grumos. Adicionar mais 2 mL de água e homogeneizar. Transferir a mistura para BV 50 mL. Adicionar e agitar, sucessivamente, 3 porções de 5 mL de metanol. Completar o volume com metanol. Filtrar por papel filtro. Transferir 2 mL para BV 10 mL e completar o volume com metanol 70% (v/v). Filtrar a amostra com filtro 0,45 μm .

Exatidão

A exatidão foi avaliada por meio do método de adição de citral padrão à amostra de creme base. Foram realizados 5 níveis de concentrações diferentes, com duas réplicas para cada nível, contemplando o intervalo linear.

Robustez

A robustez foi avaliada por meio da determinação da influência de variações deliberadas nos parâmetros cromatográficos (fatores) considerados críticos para quantificação dos isômeros do citral – pH da fase móvel, %da fase orgânica, temperatura do forno, coluna, vazão e comprimento de onda (Tabela 6.2).

Tabela 6.2. Fatores e níveis empregados no teste de robustez.

Fatores	Nominal	Limites	Nível (-)	Nível (+)
pH	6,0	1,0	5,0	7,0
Metanol (%)	70	2	68	72
Forno	30	2	28	32
Colunas	ACE	--	ACE	Hypersil
Vazão (mL.min ⁻¹)	1,2	0,1	1,1	1,3
Comp. onda (nm)	240	2	238	242

O efeito dos fatores foi obtido empregando desenho factorial fracionado – *Placket-Burman* (11 fatores e 12 experimentos). Cinco fatores *dummy* foram incluídos para completar o experimento e foram empregados para estimar o erro experimental (Tabela 6.3).

Tabela 6.3. Desenho factorial fracionado de Placket-Burman.

Exp	Col	D1	MetOH	Temp	D2	D3	D4	pH	Fluxo	λ	D5
1	(+)	(+)	(-)	(+)	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)	(+)	(-)
2	(-)	(+)	(+)	(-)	(+)	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)	(+)
3	(+)	(-)	(+)	(+)	(-)	(+)	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)
4	(-)	(+)	(-)	(+)	(+)	(-)	(+)	(+)	(+)	(-)	(-)
5	(-)	(-)	(+)	(-)	(+)	(+)	(-)	(+)	(+)	(+)	(-)
6	(-)	(-)	(-)	(+)	(-)	(+)	(+)	(-)	(+)	(+)	(+)
7	(+)	(-)	(-)	(-)	(+)	(-)	(+)	(+)	(-)	(+)	(+)
8	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)	(+)	(-)	(+)	(+)	(-)	(+)
9	(+)	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)	(+)	(-)	(+)	(+)	(-)
10	(-)	(+)	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)	(+)	(-)	(+)	(+)
11	(+)	(-)	(+)	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)	(+)	(-)	(+)
12	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)

Os efeitos dos fatores são calculados da seguinte forma:

$$E_x = \frac{\sum Y(+)}{N/2} - \frac{\sum Y(-)}{N/2} \quad \text{Equação 6.1}$$

onde E_x é o efeito do fator em análise; $\sum Y(+)$ e $\sum Y(-)$ são a soma das respostas onde x (fator) está nos níveis extremos (+) e (-), respectivamente; e N é o número de experimentos do desenho experimental.

A estimativa do erro do experimento (E_e) é obtida pela seguinte fórmula:

$$E_e = \sqrt{\frac{\sum E_{dummy}^2}{n_{erro}}} \quad \text{Equação 6.2}$$

Onde $\sum E_{dummy}^2$ é a soma quadrada dos n_{erro} *dummy*.

Finalmente, pode-se determinar a significância dos fatores através da realização do teste *t-Student*, da seguinte maneira:

$$t_{calc} = \frac{E_x}{E_e} \quad \text{Equação 6.3}$$

O valor t_{calc} será comparado com $t_{crítico}$ bicaudal para $\alpha=0,05$ e n_{erro} graus de liberdade. Alternativamente, pode-se estimar o valor crítico (E_{crit}) para determinação da significância estatística dos efeitos com a seguinte equação:

$$E_{crit} = t_{crit} \times E_e \quad \text{Equação 6.4}$$

Preparação do Creme Base

As matérias-primas empregadas na preparação do creme base para incorporação do citral estão listadas na Tabela 6.4. As fases oleosa e aquosa foram aquecidas à 75 °C e, então, a fase aquosa foi vertida sobre a fase oleosa, lentamente e sob agitação. A agitação foi mantida e quando a temperatura encontrava-se abaixo de 45 °C o citral foi incorporado à formulação. Parte da formulação, sem adição de citral, foi separada para

estudo da especificidade e exatidão do método analítico. O creme obtido foi acondicionado em bisnaga de polipropileno.

Tabela 6.4. Substâncias empregadas na preparação do creme base.

Substância	Peso (g)
Álcool Cetoestearílico Etoxilado ^b	2,75
MEG ^b	3,00
Polissorbato 80 ^a	1,00
Álcool Cetílico ^b	4,00
Álcool Estearílico ^b	2,50
Miristato de Isopropila ^b	3,00
Imidazolinidiluréia ^a	0,10
BHT ^b	0,20
EDTA Na ^a	0,05
Água	87,8

^a fase aquosa; ^b fase oleosa.

Purificação dos isômeros

Para purificação dos isômeros foram injetados 40 µL de solução de citral a 6,0 mg.mL⁻¹. Foi utilizada a mesma coluna cromatográfica citada anteriormente, porém a fase móvel empregada foi metanol: água (66:34, v/v) para se obter melhor resolução entre os picos dos isômeros. Estes foram monitorados em 254 nm e somente os ápices dos picos foram coletados.

Estabilidade

Soluções contendo os isômeros do citral purificados por LC foram diluídos com tampão fosfato (10 mM) em diferentes pH (4,0; 5,0; 6,0; 7,0 e 8,0). As soluções obtidas foram acondicionadas em frascos de polipropileno e mantidas a 6, 18 ou 30 °C. Estas soluções foram analisadas no tempo 0, 9 e 30 dias. Amostras do creme e de citral em etanol 95% (v/v), etanol 70% (v/v) e acetona, foram mantidos sob refrigeração (6 °C) e avaliados nos tempos 0, 9, 30 e 60 dias.

6.3 Resultados e Discussão

A Figura 6.2 apresenta o cromatograma do creme base e da amostra de creme contendo citral. É possível verificar a ausência de sobreposição de picos nos tempos de retenção do neral e geranial. Além disso, não foram detectadas impurezas na análise dos picos dos isômeros do citral, sendo que ambos apresentaram índice de pureza igual a 1,000.

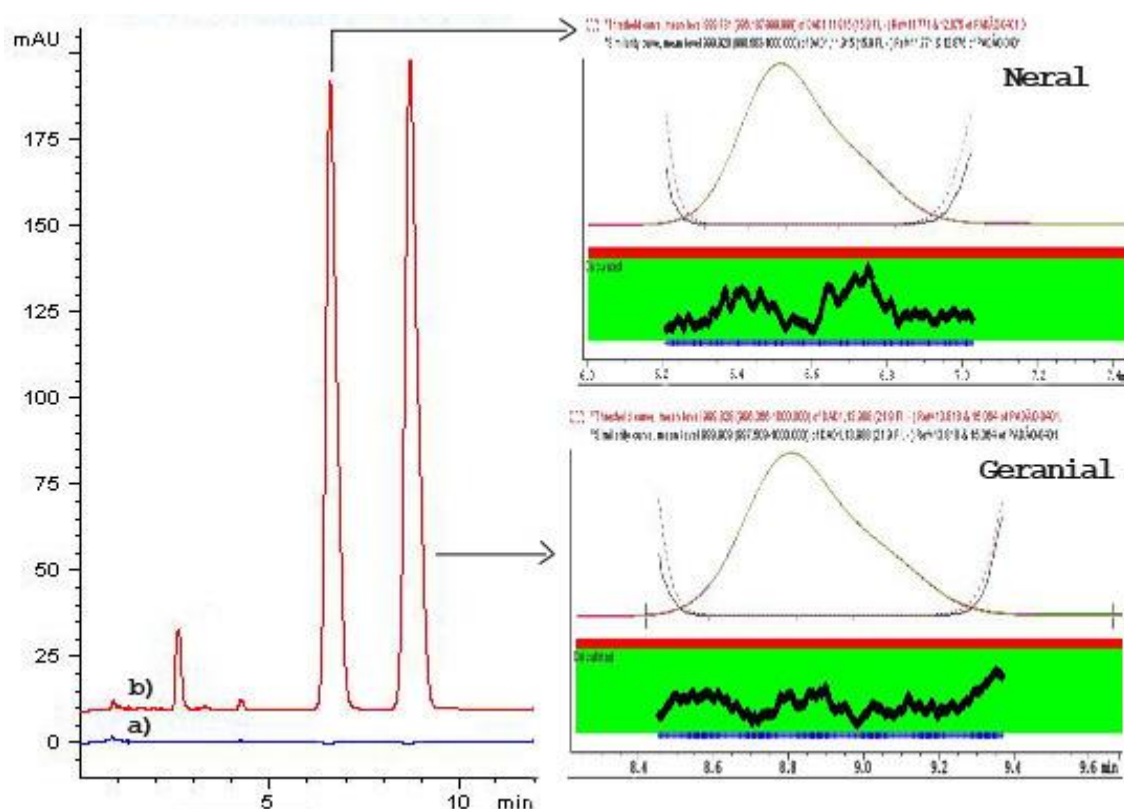


Figura 6.2. Cromatogramas em 240 nm do creme base (a) e do creme contendo citral (b) com avaliação das purezas dos picos do neral e geranial.

A Tabela 6.5 apresenta o resumo dos resultados dos parâmetros linearidade, precisão e exatidão. A excelente correlação entre a área do pico e concentração dos isômeros, a baixa variabilidade verificada dentro e entre os dias de análise em ensaios com a amostra realizados por diferentes analistas e os valores de recuperação próximos a 100% confirmam que o método possui linearidade, precisão e exatidão.

Tabela 6.5. Resumo dos resultados da Linearidade, precisão e exatidão.

Parâmetro	Neral	Geranial
Linearidade		
Equação (r^2)	$y=88,57x+4,39$ (0,9984)	$y=96,01x+2,95$ (0,9991)
Análise dos resíduos	Sem tendências e sem <i>outliers</i>	
Precisão		
Média Dia 1 (DPR)	1,42% (1,50%)	1,47% (1,64%)
Média Dia 2 (DPR)	1,41% (0,68%)	1,55% (0,75%)
Precisão Intermediária – Média (DPR)	1,41% (1,12%)	1,51% (2,56%)
Exatidão		
Média (DPR)	99,9% (1,36%)	99,1% (1,51%)
Intervalo Confiança (95%)	99,0 – 100,8%	98,0 – 100,2%

r^2 – coeficiente de determinação; DPR – Desvio Padrão Relativo

A Figura 6.3 apresenta os efeitos percentuais dos fatores na quantificação dos isômeros do citral no teste da robustez. Nenhum fator avaliado foi significativo na quantificação dos isômeros, mesmo considerando que o efeito crítico foi muito baixo para ambos. Estes resultados confirmam que o método é robusto com relação aos fatores cromatográficos testados.

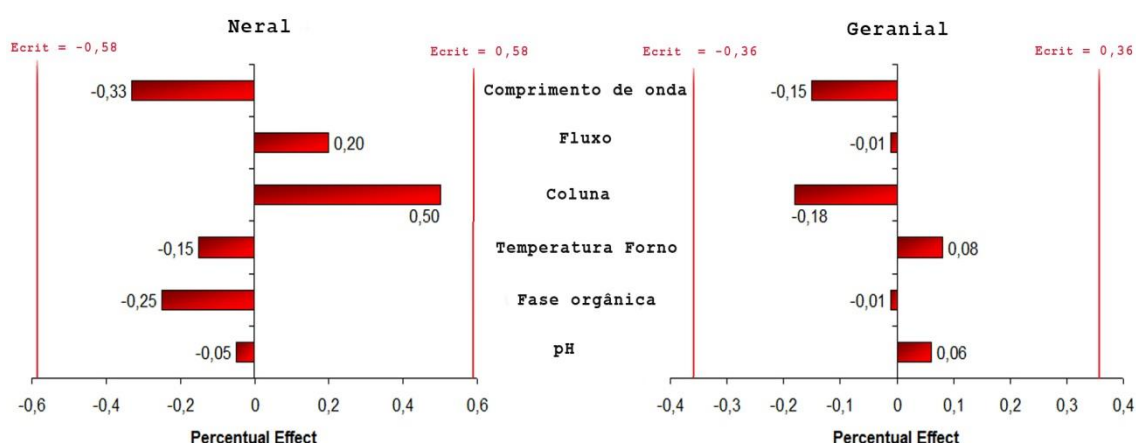


Figura 6.3. Efeito dos fatores avaliados no teste de robustez na quantificação dos isômeros do citral.

A Figura 6.4 relaciona os parâmetros cromatográficos (resolução, assimetria, pratos teóricos e fator capacidade) e os fatores considerados significativos. O único fator significativo para todos os parâmetros

cromatográficos foi a coluna. Isto confirma que a reprodutibilidade do método não é garantida pela mesma especificação de coluna, apesar de neste caso as colunas terem se mostrado robustas para quantificação. A resolução foi influenciada pela quantidade de fase orgânica na fase móvel e à medida que se aumenta a porcentagem de metanol diminui a resolução entre os picos dos isômeros. A vazão da fase móvel não apresentou efeito significativo no fator capacidade, enquanto que em temperaturas mais altas este parâmetro foi reduzido, verificando-se redução no tempo de retenção dos isômeros.

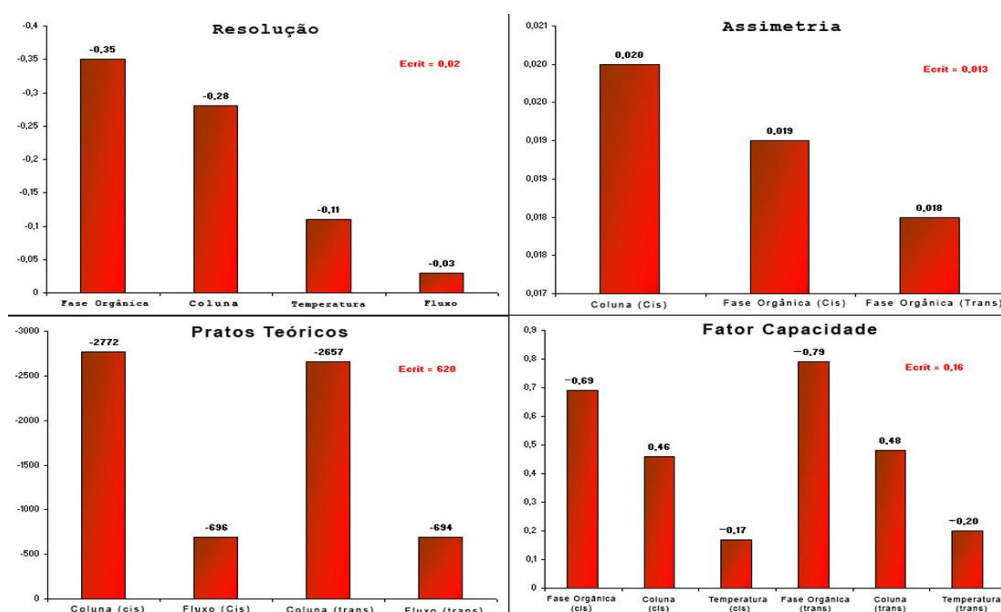


Figura 6.4. Efeitos dos fatores nos parâmetros cromatográficos.

A adequabilidade do sistema cromatográfico é importante durante o uso do método na rotina e na obtenção de resultados confiáveis e reprodutíveis. Os fatores que apresentaram resultados significativos para os parâmetros cromatográficos foram novamente testados para determinação dos seus limites de aceitação. Os níveis e fatores avaliados, assim como os limites estabelecidos para cada parâmetro encontram-se na Tabela 6.6.

Tabela 6.6. Relação dos resultados extremos encontrados para os parâmetros cromatográficos no teste de robustez e os limites de aceitação estabelecidos experimentalmente.

Parâmetros cromatográficos	Neral	Geranial	Fatores (níveis) que levam aos casos extremos
Resolução (menor resultado)		2,05	Coluna (+); Fase orgânica (+); Temperatura do forno (+); Fluxo (+)
Assimetria (maior resultado)	1,22	1,21	Coluna (+)*; Fase Orgânica (+)
Eficiência da coluna (menor resultado)	12187	12350	Coluna (+); Fluxo (+)
Fator capacidade (menor resultado)	3,05	3,34	Coluna (-); Fase orgânica (+); temperatura do forno (+); pH (-); fluxo (+)

* fator e nível significativo somente para o pico do neral. No restante dos fatores verificou-se influência para ambos os picos (neral e geranial).

Os limites cromatográficos estabelecidos experimentalmente encontram-se de acordo com os valores preconizados pela literatura (CDER, 1994; SHABIR, 2003). Assim, os valores dos parâmetros cromatográficos presentes na Tabela 6.6 devem ser considerados como limites durante o uso do método na rotina (adequabilidade do sistema). Este cuidado garante que os resultados de identificação e quantificação obtidos em análises posteriores estejam em acordo com as condições em que o método foi validado.

Soluções contendo neral ou geranial purificados, em concentrações iniciais aproximadas de 30 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, foram submetidas a diferentes pH (diluições com tampão fosfato na faixa de 4,0-8,0) e acondicionadas em incubadora refrigerada a 18 °C, além disso, soluções em água foram acondicionadas em diferentes temperaturas (6, 18 ou 30 °C) para avaliação de sua estabilidade. Durante o estudo foram quantificados o geranial e neral e os produtos de degradação foram calculados por diferença do percentual inicial (100%).

A análise da estabilidade do geranial (Figura 6.5) permite verificar que em solução aquosa o geranial rapidamente é degradado. Além disso, em pH 6,0 foi observada menor degradação no tempo 30 dias em relação aos outros pH avaliados.

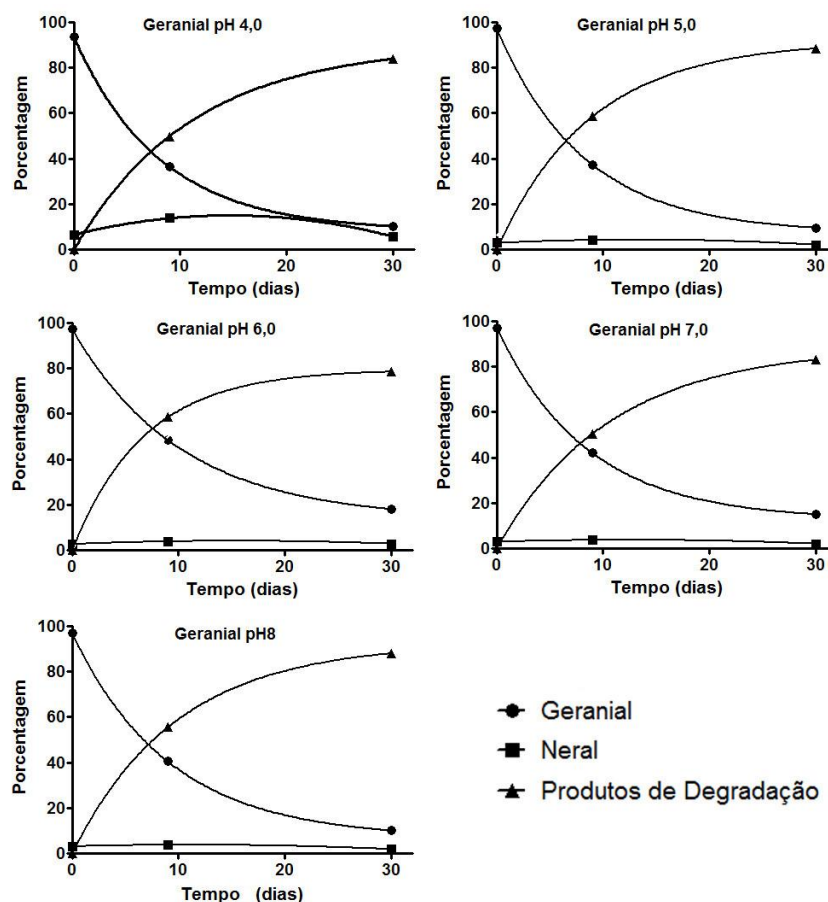


Figura 6.5. Estabilidade do geranial em diferentes pH. Cada ponto é média de três determinações.

Para o neral resultados semelhantes ao verificado para o geranial foram observados (Figura 6.6). Isto pode ser explicado pelas propriedades físicas e químicas semelhantes dos isômeros, incluindo sua reatividade. Mais uma vez se verificou intensa degradação e, no caso do neral, os pH 6,0 e 8,0 foram onde a degradação foi menor. Estes resultados estão em acordo com outros estudos de estabilidade com o citral que demonstraram a instabilidade em meio ácido do citral (KIMURA *et al.*, 1983; UENO *et al.*, 2004; CHOI *et al.*, 2009).

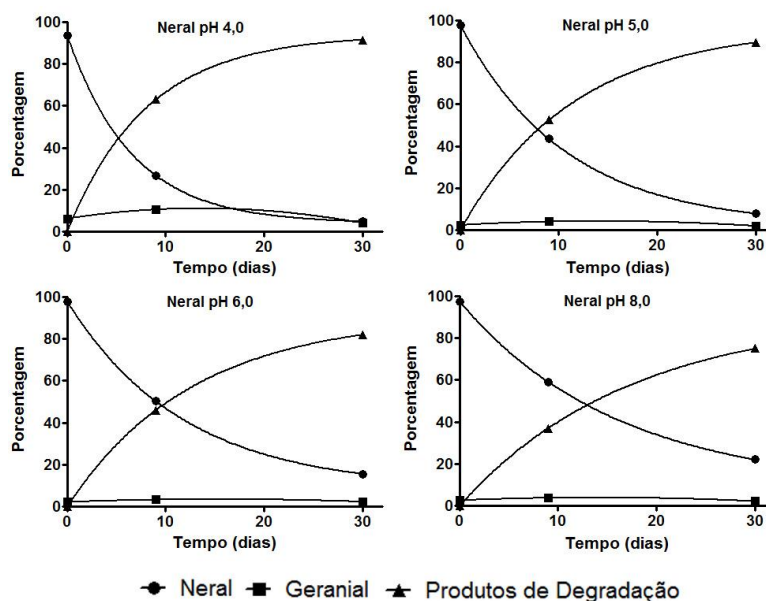


Figura 6.6. Estabilidade do neral em diferentes pH. Cada ponto é média de três determinações.

A Figura 6.7 apresenta o cromatograma do neral em pH 4,0 nos tempos 0 e 30 dias. Verifica-se a degradação do neral e estabilização da quantidade geranial. Não foi verificada a presença de outros picos em análises com 60 min de corrida nos comprimentos de onda de 200, 205, 210, 225 e 240 nm. Isto indica a formação de produtos sem grupamentos cromóforos ou sem absorvidade significativa. Deve-se considerar também que, com 30% de água na fase móvel substâncias, como o mirceno, ficam retidas na coluna.

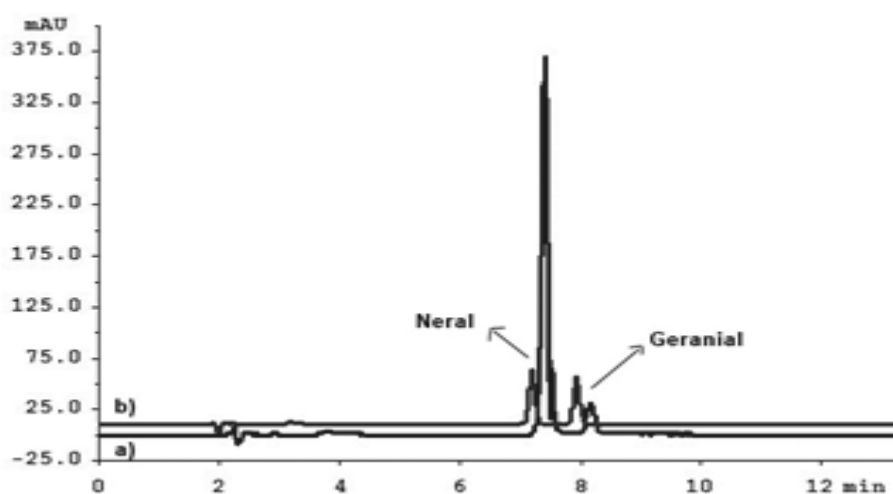


Figura 6.7. Cromatograma em 240 nm de solução de neral em pH 4,0 no (a) tempo zero e (b) após 30 dias de acondicionamento a 18 °C.

A Figura 6.8 apresenta o perfil de degradação do geranial e neral em função do tempo em diferentes temperaturas de acondicionamento. Considerando que a volatilização foi minimizada empregando frascos herméticos cheios de solução, pode-se verificar que a medida que a temperatura aumenta maior degradação é observada. Nota-se que o perfil da curva a 30 °C demonstra rápida degradação dos isômeros em meio aquoso, enquanto que a 6 °C a curva possui uma queda menos acentuada.

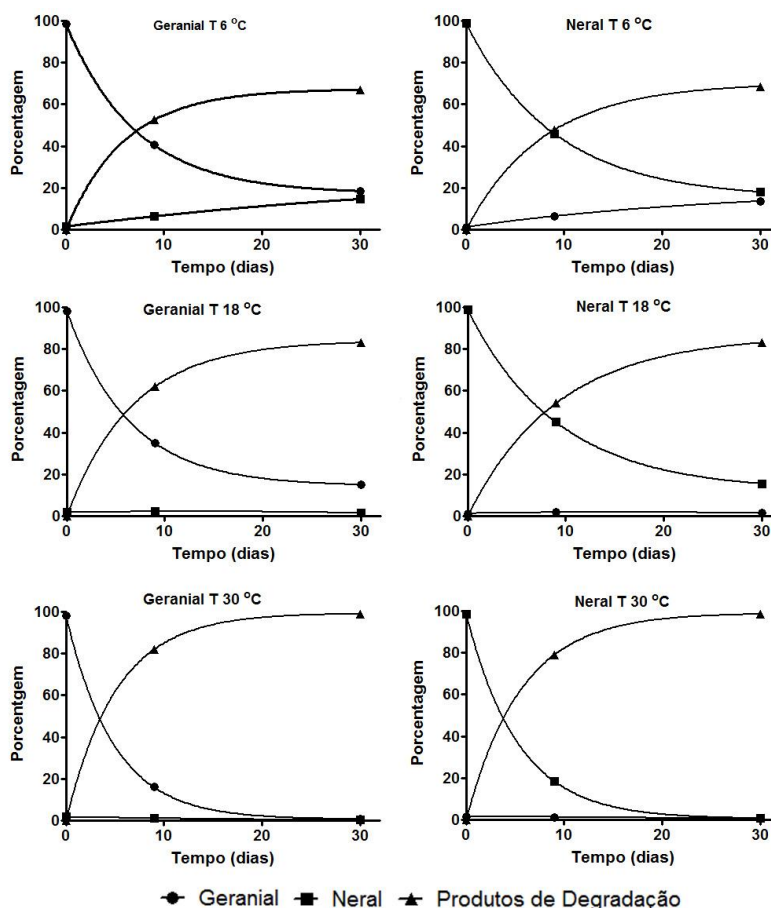


Figura 6.8. Estabilidade do geranial e neral em diferentes temperaturas. Cada ponto é média de três determinações.

Diferente das soluções aquosas, as soluções em solventes orgânicos e o creme apresentaram melhores resultados com relação à estabilidade dos isômeros do citral (Figuras 6.9 e 6.10).

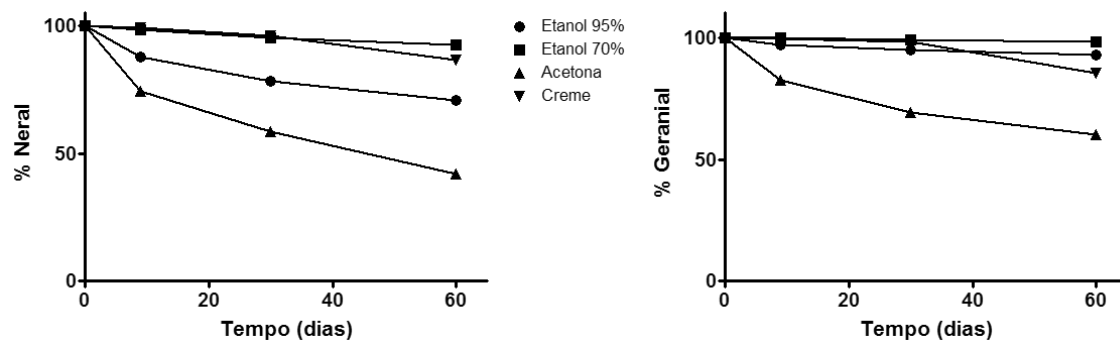


Figura 6.9. Estabilidade dos isômeros do citral em diferentes solventes e no creme, mantidos a temperatura de 6 °C. Cada ponto é média de duas determinações.

A acetona não se mostrou como um bom solvente, já que, em média 50% do citral foi degradado em 60 dias. O creme apresentou baixa degradação até 30 dias, porém na análise em 60 dias havia degradado praticamente 15% do citral. Etanol 95% apresentou maior degradação para o neral do que para o geranial com degradação levemente superior a 15% em 60 dias. O etanol 70% foi o solvente com melhores resultados. O geranial praticamente manteve-se, em termos de concentração, e o neral teve uma leve queda. A quantidade de citral, após 60 dias, foi superior a 95%.

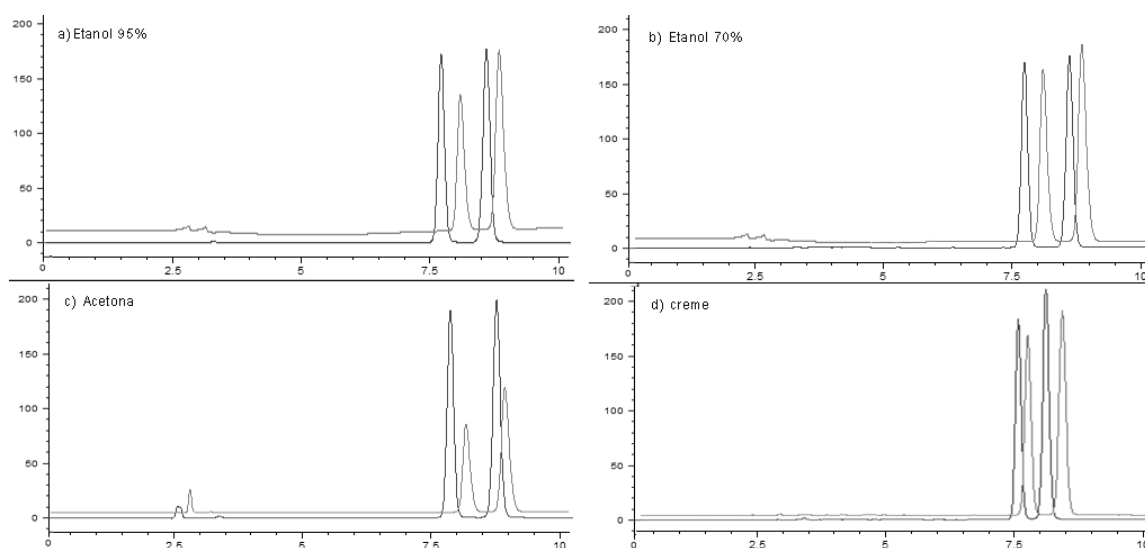


Figura 6.10. Cromatograma em 240 nm do citral no tempo zero e após 60 dias de acondicionamento a 6 °C, nas diferentes soluções e no creme de citral. a) Etanol 95%; b) Etanol 70%; c) Acetona; d) Creme.

6.4 Conclusão

A utilização da LC-UV para quantificação dos isômeros do citral é uma alternativa à técnica de CG para formulações que contêm altos teores de água. O método por LC-UV validado possui preparação simples e rápida das amostras de creme, é reprodutível e exato, e permite a análise individual dos isômeros com pequenos tempos de análise.

O neral e geranial em meio aquoso são suscetíveis ao processo de isomerização, independentemente do pH e temperaturas avaliadas. O citral apresentou estabilidade quando mantido a 6 °C em etanol 70% por pelo menos 60 dias.

**7 CAPÍTULO IV - DESENVOLVIMENTO DE MÉTODO
POR HPLC-DAD PARA QUANTIFICAÇÃO DE
ANTIFÚNGICOS EM ESTUDO DE PERMEAÇÃO**

7.1 Introdução

Atualmente, os parâmetros de desempenho analítico necessários para as diferentes categorias de testes e seus requisitos gerais são bem entendidos. No entanto, há uma tendência para o uso indevido das guias de validação de métodos analíticos como uma lista de características que são automaticamente aplicadas, levando a uma rápida validação. Porém, existe o risco de se tomar decisões incorretas devido à escolha equivocada ou pouca compreensão do método. Como os ensaios analíticos integram todo processo de desenvolvimento e controle de fármacos, procedimentos inapropriados podem conduzir, por exemplo, a decisões erradas, repetição de trabalho (resultados fora das especificações) e atrasos. Conseqüentemente, o planejamento dos ensaios e a avaliação dos resultados devem se ajustar ao procedimento analítico em estudo, para que se tenha a compreensão da sua performance real. Só assim, pode-se comprovar a obtenção de um procedimento “apropriado para a finalidade pretendida” (ERMER, 2001).

A cromatografia a líquido associada a detectores de arranjo de diodos (DAD) é uma técnica potente, pois alia a precisão e reprodutibilidade da técnica de UV à possibilidade de obtenção de espectros. Assim tem-se cromatogramas em 3 dimensões (tempo, intensidade do sinal e comprimento de onda) com maior quantidade de informação. Destaca-se neste tipo de detector a possibilidade da avaliação da pureza de pico com grande sensibilidade, desde que os parâmetros instrumentais sejam ajustados de maneira adequada.

7.2 Artigo

A seguir encontra-se artigo que será submetido à revista *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. Este artigo descreve o desenvolvimento e caracterização de métodos por HPLC-DAD que serão empregados na parte analítica do estudo de permeabilidade. As substâncias avaliadas foram: isômeros do citral, geraniol, fluconazol, miconazol, terbinafina e butenafina.

O nerol não foi incluído no artigo, pois não possui resolução com relação ao pico cromatográfico do geraniol. No estudo de permeação as formulações foram avaliadas independentemente, não havendo assim problema de especificidade para o nerol ou geraniol. É importante ressaltar que grandes esforços foram dispensados para obtenção de método que garantisse a resolução entre estes isômeros. A Figura 7.1 apresenta um método que foi capaz de separar estes isômeros. Contudo, o tempo de análise mostrou-se extremamente alto e dificultaria as análises do estudo de permeação.

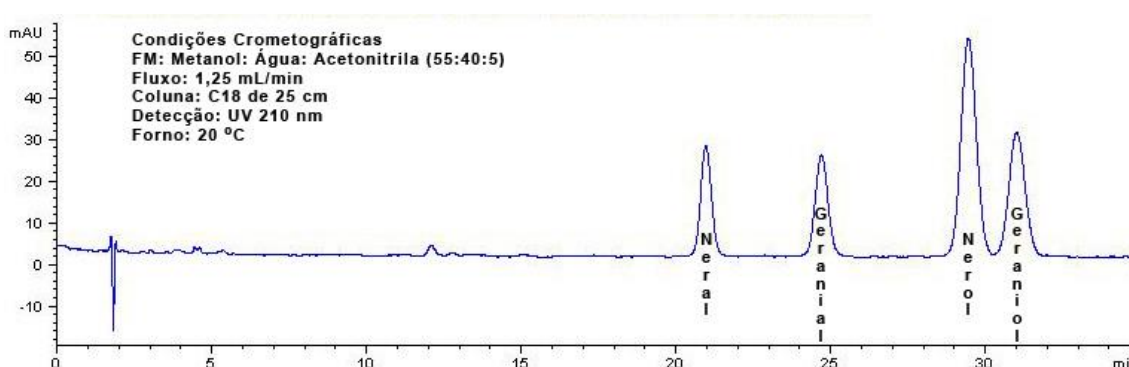


Figura 7.1. Cromatograma obtido por HPLC-DAD para análise do Citral, Nerol e geraniol.

HPLC-DAD for the Determination of Three Different Classes of Antifungals: Method Characterization, Statistical Approach, and Application to a Permeation Study

Abstract

This study describes and characterizes methods for HPLC-DAD analysis of formulations containing molecules with antifungal activity of three different classes: terbinafine and butenafine (allylamines), miconazole and fluconazole (azoles), and geraniol, neral and geranial (monoterpenes). All methods used the same chromatographic column (RP-18) enabling the analysis to be performed in a single batch. The analytical parameters (linearity, precision and accuracy) were calculated and discussed in detail using specific statistical approaches. All substances showed satisfactory results. Limits of 1.3% to mean repeatability and 2.0% for intermediate precision are suggested as acceptance criteria in

validation of methods by HPLC-DAD, in situations where there is no extensive pretreatment of the samples. The methods proved to be robust and significant factors were discussed regarding their influence on chromatographic parameters (retention time, resolution, tailing factor and column efficiency). Finally, the application of the developed methods was demonstrated by the results of a permeation study of the antifungal agents through bovine hoof membranes.

Keywords: Terbinafine, Butenafine, fluconazole, miconazole, geraniol, citral.

Introduction

The analysis of different classes of substances is challenging, can be exhaustive and often requires the use of various techniques. Reversed-phase (RP) high performance liquid chromatography (HPLC) remains one of the most widely used techniques for quantification of drugs and it can be used to analyze several molecules in a single run. However, differences in solubility, ionization and molecular weight can make the analysis complex and usually each substance will be better quantified under specific chromatographic conditions.

Statistical analysis of the analytical parameters is crucial to better understand the quantification methods. Several tests and statistical parameters are used to interpret analytical results and each one has its application and interpretation and the acceptance limits are not always obvious [1-4].

The characterization of chromatographic parameters such as retention time, resolution, tailing factor and column efficiency, and the definition of how they behave with deliberate variation in the system are essential for routine analysis and the transference of methods between laboratories. The robustness test examines the potential sources of variability in one or more responses of the method and it plays a key role in quantitative and system suitability aspects [5-7].

Miconazole (MCZ) and fluconazole (FLU) are potent antifungals against dermatophytes, as well as terbinafine (TBF) and butenafine (BTF) [8-11].

Geraniol (GOL) and citral (CIT) are monoterpenes that also are active against dermatophytes [12-14]. Onychomycoses are fungal infections of the fingernails and toenails. Dermatophytes are the main cause of onychomycosis and clinical treatment lacks effective products [15]. The efficacy of this kind of treatment depends largely on how the drug is capable of permeating and reaching the deeper layers of the nail in inhibitory concentrations. The permeation of drugs through membranes of bovine hoof is used as a model for human nail and the research of new formulation, penetration enhancers and antifungals [16-18].

Citral is a mixture of two geometric isomers (neral (NAL) and geranial (GAL)) and they are usually found in similar proportions, around 50% for each isomer [19]. In this study, the HPLC-DAD method was able to separate the isomers and, for this reason, they were treated as isolated substances.

The aim of this study was to develop methods for liquid chromatography and DAD detection for GOL, NAL, GAL, FLU, MCZ, TBF and BTF in formulations and the media acceptor of a permeation study. The challenge has been to develop methods for the antifungals employing the same column for all of them, so that the analysis could more easily be performed in batches. Statistical analyses were performed to better characterize and interpret the analytical results. The robustness test was used to define the significant factors and their influence on chromatographic parameters (retention time, resolution, tailing factor and efficiency of the column). Finally, the analytical methods were applied to evaluate the amounts of drug permeated through bovine hoof membranes.

Materials and Methods

GOL, CIT and N-acetyl-L-cysteine (AC) were purchased from Sigma Co (St Louis, MO, USA). Terbinafine hydrochloride (TBF), fluconazole (FLU) and ascorbic acid (AA) were kindly supplied by Cristalia[®] (São Paulo, Brazil). Miconazole (MCZ) and Butenafine hydrochloride (BTF) were kindly supplied by Brazilian Pharmacopoeia (Santa Maria, Brazil) and Brainfarma Co (Rio de Janeiro, Brazil), respectively. Methocel[®] F4M (HPMC) was supplied by Colorcon (Cotia, Brazil). All reagents were analytical or HPLC grade.

Acetonitrile and methanol were purchased from Tedia Co (Fairfield, USA), the ethanol and triethylamine from Merck Co (Darmstadt, Germany). Purified water was obtained by a Millipore® Direct-Q 3UV with pump (Molsheim, France).

Preparation of samples

Standard curves with five concentrations ranging from 1 to 100 µg.mL⁻¹ were employed for each drug. All formulations had the equivalent of 5 mg of drug weighted and diluted with ethanol 70% (v/v) to obtain a concentration of 100 µg.mL⁻¹. The samples were filtered through teflon filter (Millipore® - 0.45 µm) before injection into an HPLC. All standard solutions were stable for at least 48 h at ambient temperature.

Chromatographic conditions

Analyses were performed in a Shimadzu (Kyoto, Japan) HPLC consisting of a pump system (LC-20AT), a diode array detector (SPD-10A), a system controller (CBM-20A), an auto injector (SIL-20A), an oven (CTO-20A) set at 25 °C, and Phenomenex® (Torrance, CA, USA) Synergi Fusion C18 column (250 mm x 4.0 mm, 4 µm). The injection volume was 20 µL. The chromatographic conditions are described in Table 7.1.

Table 7.1. Chromatographic conditions.

Drug	Mobile Phase	Flow rate (mL.min⁻¹)	WL (nm)
GOL, NAL, GAL	ACN:Water (52:48, v/v)	1.2	210
FLU	MetOH: ACN: NH ₄ Ac (pH 6.7; 6.5 mM) (30:15:55, v/v/v)	1.0	210
MCZ	ACN: TEA (pH 5.0; 0.3%) (82:18, v/v)	1.2	225
TBF, BTF	ACN: TEA (pH 5.0; 0.3%) (85:15, v/v)	1.2	282

WL: wavelength; MetOH: methanol; ACN: acetonitrile; NH₄Ac: ammonium acetate; TEA: Triethylamine.

Table 7.2 summarizes the variations in the conditions employed in the chromatographic robustness test. When substituted, the amount of methanol in relation to the original percentage of acetonitrile in the mobile phase was increased (+ 5-10%). This was done because acetonitrile is considered a stronger eluent in reverse phase chromatography.

Table 7.2. Variations in chromatographic conditions for the robustness test.

Drug	Replacement of ACN by MetOH	Water (%)	pH	TEA
GOL, NAL, GAL	+	± 5	-	-
FLU	+	± 3	+ (3.0, 4.5)	-
MIC, TBF, BTF	+	± 3	+ (3.0, 6.0)	+ (0% and 0.2%)

Preparation of the Hoof Membranes

About 200 µm thick slices were taken from bovine hooves with a microtome (Reichert Viena, Austria). The slices were punched with a 12 mm diameter. Careful visual inspection was carried out looking for pores or any discontinuity. The thickness of the swollen slices/membranes was measured with a digital micrometer (Mitutoyo, Tokyo, Japan).

Drug formulation

HPMC gel 3% (w/v) in ethanol 70% was prepared under magnetic stirring and heating (70 °C). The gel base obtained was translucent and consistent. Formulations of antifungals (GOL, NAL, GAL, FLU, MIC, TBF and BTF) were prepared at 2% in 50% gel base, 5% acetylcysteine, 0.2% ascorbic acid and the weight adjusted with ethanol 70%. GOL-Lacquer was prepared adding 50% of

lacquer base (Colorama® Lóréal, Rio de Janeiro – Brazil), GOL 2% and the weight adjusted with ethanol.

Permeation Studies

The bovine hoof membrane was inserted in the diffusion cell. The acceptor compartment was filled with a solution containing AA 0.2% in ethanol 70% (acceptor media). The cells were equilibrated at 32 °C in a water bath and maintained under magnetic stirring. Approximately 2 mL of the formulation was added and 1.0 mL samples were taken from the acceptor media at 6, 12, 18, 24, 36 and 48 h. The acceptor compartment was immediately filled with 1.0 mL of acceptor media.

RESULTS AND DISCUSSION

The design of scientific experiments should consider the feasibility and ease of obtaining reliable and meaningful results. For this purpose, chromatographic methods were developed to analyze seven antifungals, contemplating three different classes: allylamines (TBF and BTF), azoles (MCZ and FLU) and monoterpenes (GOL, NAL and GAL). The approach used was to adjust the chromatographic conditions so that all drugs could be analyzed with the same column. Thus, the samples were run in batches and the permeation study of antifungals through membranes of bovine hooves could have short sampling intervals without freezing the samples.

Analytical parameters and statistical analysis

An essential requirement of a chromatographic method is the ability to verify the purity of the separated species ensuring that there are no coeluting impurities contributing to the peak response. The specificity of the methods developed was assessed by determining the peak purity from a spectra range of 205 – 300 nm. Background correction was selected for substances with low wavelength determination (GOL and FLU) to avoid influence from the noise of mobile phase. The peak was considered pure when its peak purity index was equal or

higher than 0.999 and the purity angle was lower than the threshold angle (visual determination). All conditions for peak purity determination were first employed in standard samples and immediately after that in the test samples (formulation and the receptor media from the permeation study). No impurity was detected for antifungal peaks in any of the chromatograms of standard or test samples. The purity determined by comparing the UV spectra of a peak has some limitations. Among them, is the case where the impurity completely coelutes with the main analyte, with both having exactly the same peak profile. To minimize this problem, the spectrum from the peak apex of each antifungal standard was recorded in the software library. The spectrum of peak upslope, apex and downslope of the samples from the permeation study and from the formulation tested after 48 h of incubation was searched for in the software library. A similarity index greater than 0.999 was considered as indicative of purity. All samples pass this test and Figure 7.2 shows the chromatograms and the results of searching for spectra in the software library.

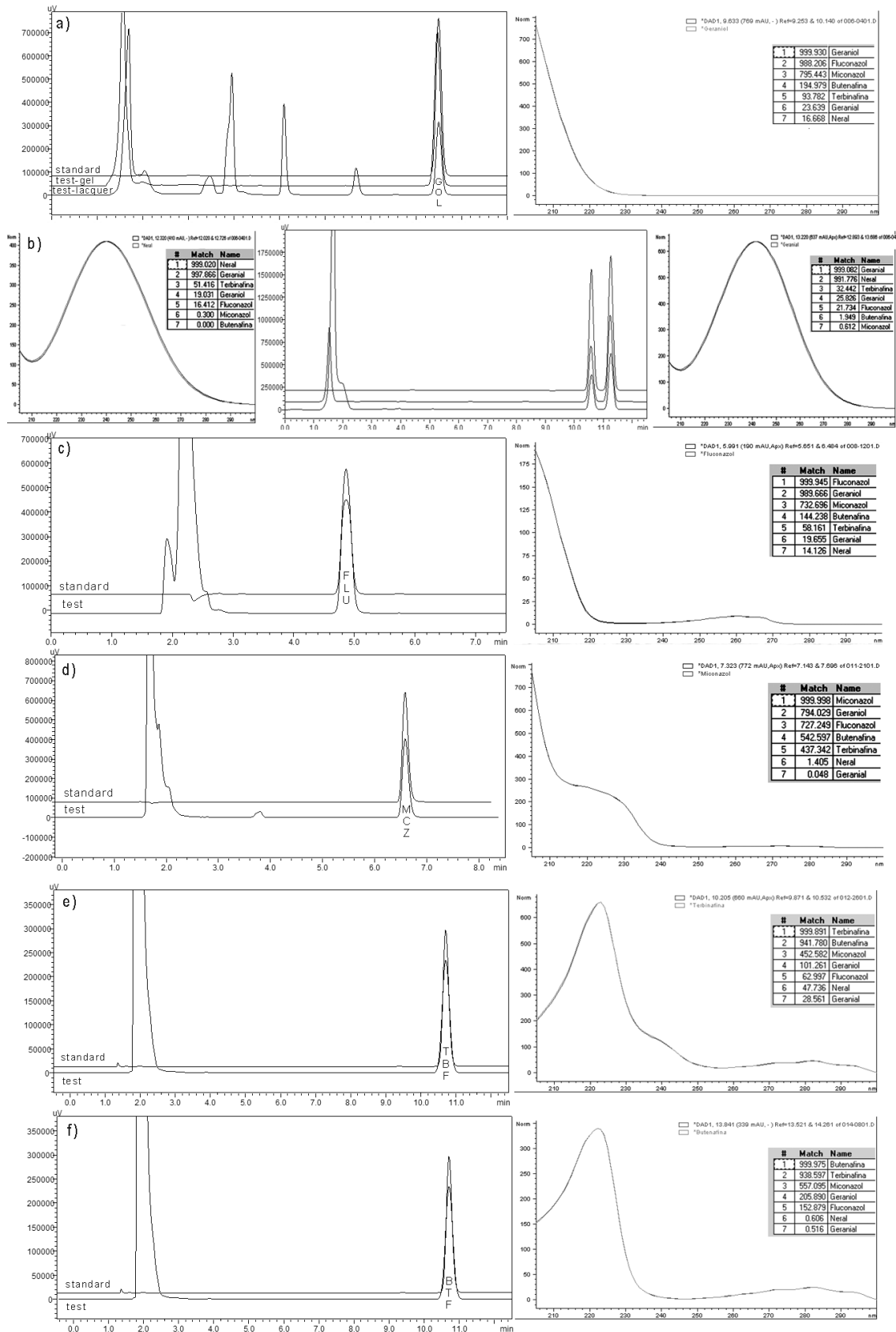


Figure 7.2. Chromatograms, library search and spectrum of: a) GOL; b) NAL and GAL; c) FLU; d) MCZ; e) TBF; f) BTF.

Good statistical parameters of linearity ensure good estimates of the amount of drug in the test samples. Some of these parameters refine the analysis and ensure the accuracy of the quantification method (Table 7.3). The significance of regression (95% confidence interval (CI_{95%}) should not contain zero) and the correlation coefficient should be investigated, but generally, in the HPLC-DAD analysis, these parameters are statistically significant. Parameters such as precision of regression, relative percentage of intercept and residual analysis should also be investigated. The relative precision of the regression (RSD_{Reg}) can be estimated from the ratio of the standard error of regression (SER) and the mean response predicted by the linear regression and, in concept, is similar to the Relative Standard Deviation (RSD) calculated in the precision test (Equation 1).

$$RSD_{Reg} = \frac{\sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (Y_i - \hat{Y}_i)^2}{n-2}}}{b \times \bar{X}} \times 100\% = \frac{SER}{b \times \bar{X}} \times 100\% \quad (1)$$

where \hat{Y}_i is the predicted response, Y_i is the observed response, b is the slope and \bar{X} is the mean drug concentration.

In general, RSD_{Reg} values smaller than those expected for a precision test can be expected. As can be seen from the results of this study, in the analysis by HPLC-DAD in which the standard curve samples do not undergo pre-treatment it is common to see RSD_{Reg} values lower than 1%. High RSD_{Reg} values indicate that the observed responses deviate substantially from predicted responses. This reduces the accuracy with respect to predictions of the amounts of drug in the test samples.

Table 7.3. Summary of analytical parameters for the seven antifungals analyzed by HPLC-DAD.

	GOL	NAL	GAL	FLU	MCZ	TBF	BTF	
Linearity^a	Slope	405,7	814.5	953.3	274.2	445.4	191.6	167.3
	Intercept	-0.23	27.7	40.8	13.2	13.6	-4.0	3.9
	RSD _{reg} (%)	0.64	0.32	0.35	0.57	0.60	0.30	0.25
	Interception (%)	0.00	0.09	0.12	0.13	0.08	-0.06	0.06
	Standardized residual range	-1.67, +1.90	-1.72, +1.70	-1.47; +1.73	-1.87; +2.00	-1.98; +1.94	-1.95; +1.84	-1.60; +1.75
Accuracy^b		99.4	91.1	90.2	99.8	98.9	101.6	100.2
	CI _{95%}	98.4, 100.4	81.4, 100.4	79.6, 100.8	97.6, 102.0	97.7, 100.0	99.9, 103.3	99.3, 101.1
Repeatability^c	RSD _{Day 1}	1.51	0.67	0.70	0.70	1.13	0.57	0.87
	RSD _{Day 2}	0.48	1.65	1.98	2.00	1.19	0.85	0.61
Injection Repeatability^d	RSD _{Day 1}	0.31	0.26	0.28	0.09	0.37	0.42	0.32
	RSD _{Day 2}	0.16	0.42	0.36	0.25	0.68	0.22	0.42
Intermediate Precision^b		1.01	10.12	11.24	2.10	1.09	1.57	0.84

^a $n = 10$; ^b $n = 6$; ^c $n = 3$; ^d $n = 5$.

If the chromatographic peaks do not contain impurities and the ratio of response and concentration is similar over the linearity range, especially in the central points, it would be expected that the intercept (a) is low in relation to the mean response predicted (Equation 2). In this case, values of %Intercept equivalent to RSD of precision test can be expected. Thus, the variation in relation to the expected zero intercept can be explained by the method variability. High values of %intercept can indicate the presence of interference of another substance. The results of the intercept for the drugs tested were very low. This is due to the large concentration range (1-100 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$). However, in narrower ranges of concentration, as in the determination of drugs in medicines (80-120%), the intercept can easily be considered significant. One way to solve this problem is to add a point with a lower concentration on the standard curve.

$$\%Intercept = \frac{a}{b \times \bar{X}} \times 100\% \quad (2)$$

Errors in sample preparation or equipment destabilization can lead to atypical results or outliers. Outlier, in linear regression, is a response which largely deviates from expected response. The search for outliers can be done easily by the standardized residuals (SR) (Equation 3) or residual plots. Values of SR between -2.0 and +2.0 indicate the absence of outliers. Results out of this range can indicate the presence of an outlier and a statistical test can be performed to confirm it [2]. Outliers greatly influence the slope (especially when present at the extreme points of the curve) and the intercept (when present in the central points) deteriorating the predictive ability of the model. Excluding the outlier usually ensures the adjustment of statistical parameters of the regression. However, it is important to identify what caused the outlier to avoid problems in the prediction of test samples.

$$SR_i = \frac{(Y_i - \hat{Y}_i)}{\sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (Y_i - \hat{Y}_i)^2}{n-1}}} = \frac{R_i}{\sigma_R} \quad (3)$$

where R_i is the residual i and σ_R is the standard deviation of residuals.

Method accuracy was evaluated by the ratio between the amount of drug found experimentally and the amount added in the formulation (~ 2% of drug). The formulations were kept at 32 °C to simulate the incubation temperature of the permeation study. The formulations were analyzed at zero and 48 h, covering the entire period of the permeation study. The results of the accuracy test were satisfactory, except for NAL and GAL that showed reduced concentrations at 48 h due to degradation. The reactivity of these two compounds is known and ascorbic acid was added to the formulations to improve stability. However, the formulation contains large amounts of acetylcysteine having thiol and amine groups which can react with the aldehyde group of NAL and GAL.

The results of repeatability showed low variability because there is no pretreatment of samples, and these were only diluted and filtered prior to HPLC analysis. The degraded samples, NAL and GAL, had increased variability in intermediate precision and for this reason were not included in the estimation of overall precision of the experiment. The mean repeatability (\overline{RSD}_{rep}) and the overall intermediate precision ($\overline{RSD}_{Int.Prec}$) were calculated by Equations 4 and 5, respectively.

$$\overline{RSD}_{rep} = \frac{\sum_{i=1}^n RSD_i}{n} \quad (4)$$

$$\overline{RSD}_{Int.Prec} = \frac{\sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (Y_i - \bar{Y})^2}{n}}}{\bar{Y}} \times 100\% \quad (5)$$

where RSD_i is the calculated repeatabilities, Y_i is the observed results and \bar{Y} is the overall mean of all antifungal determinations.

The overall values of repeatability and intermediate precision were estimated as 0.99% and 1.61%, respectively. A one-tailed 95% confidence interval for mean repeatability was calculated and maximum \overline{RSD}_{rep} values around 1.3% can be expected. Calculating the maximum variance (s_{max}^2) obtained from a 95% confidence interval (Equation 6.1), the maximum value for intermediate precision could be estimated as 2.0% (Equation 6.2). These

maximum values can be used as quality control limits in HPLC-DAD validation studies where the samples are homogeneous and easy to extract/dilute.

$$s_{max}^2 = \frac{(n-1)s^2}{\chi_{(\frac{\alpha}{2}, gl)}^2} \quad (6.1)$$

$$RSD_{max} = \frac{\sqrt{s_{max}^2}}{\bar{Y}} \times 100\% \quad (6.2)$$

where s^2 is the variance and $\chi_{\frac{\alpha}{2}, gl}^2$ is the critical value of chi-square distribution.

Injection repeatability is a requirement related to accuracy of equipment measurements. The use of replicates at the beginning of a batch analysis can mask trends that may occur during test sample runs. When the number of samples to be analyzed is small, an alternative is to use duplicates to monitor trends and estimate the value of injection repeatability (Equation 7).

$$RepInj(\%) = \frac{\sqrt{\frac{\sum_{j=1}^n (Y_{j,r1} - Y_{j,r2})^2}{2n}}}{\bar{Y}} \times 100\% \quad (7)$$

where $Y_{j,r1}$ and $Y_{j,r2}$ are the observed responses for the same sample j for injections r_1 and r_2 , respectively.

When duplicates are randomized this technique can also check whether the results show some kind of trend or drift (time effect). The injection repeatability results found for the different samples of antifungals were consistent with the variations established by the European Pharmacopoeia that has the narrower limits ($RSD_{max} = 0.73\%$ for five injections) [20].

Chromatographic parameters and robustness test

The reproducibility of the analysis during routine and successful transference of chromatographic methods between laboratories are strongly linked to good analytical results in the robustness test and a broad characterization of the significant factors of the system.

Table 7.4 shows the results of chromatographic parameters for the methods that have been developed and employed routinely. It also contains the value of RSD obtained for the test samples determined under different chromatographic conditions. For each method, different factors were considered relevant and deliberate variations were tested. .

Table 7.4. Chromatographic parameters and robustness result for the seven antifungals analyzed by HPLC-DAD.

Chromatographic parameter	GOL	NAL	GAL	FLU	MCZ	TBF	BTF
Retention time (R _t)	8.5	10.6	11.3	4.9	6.8	8.3	11.2
Theoretical Plates	19550	21259	21489	5102	15355	19102	20204
Tailing Factor	1.09	1,07	1.07	1.14	1.27	1.09	1.10
Resolution	>10	7.85	2.24 ^a	2.99	>10	>10	>10
RSD _{Robustness} (%)	0.37	0.28	0.30	0.55	0.92	0.78	0.57

^a resolution between GAL and NAL.

All methods presented low values of RSD in the robustness test and the methods were accurate even with large variations in chromatographic conditions.

The pH of mobile phase for GOL, NAL and GAL was not adjusted, since the analytes are neutral molecules. The peak width is increased for GOL, NAL and GAL when acetonitrile is replaced by methanol. Methanol increases the retention time for GOL significantly, and in this condition GOL has greater column retention than NAL and GAL. Addition of methanol increases the difference between the retention times of NAL and GAL, but as the peak width increases, there is no improvement in resolution between these peaks. Addition of water in the mobile phase improves resolution between NAL and GAL, but quickly increases the retention time and with 53% water in mobile phase the running time exceeds 20 min.

The method for FLU employed a ternary mixture of solvents, since acetonitrile increased peak width and the methanol:water mixture raise the system pressure excessively. To solve this problem, the solvent concentrations were adjusted and the flow rate set at 1.0 mL.min⁻¹. The retention time was reduced and the tailing factor was significantly increased when the pH of the buffer was adjusted to 3. This was probably due to ionization of FLU that has a pKa of 2.03.

The chromatographic conditions for MCZ, BTF and TBF are very similar and the highest concentration of acetonitrile for analysis of allylamines was employed to reduce the retention time of these analytes. The adjustment of the pH to 3 significantly reduces the retention time of these analytes, particularly for TBF and BTF. The withdrawal of triethylamine greatly increases the tailing factor. The pH adjusted to 3 improves the tailing factor, however, the use of triethylamine yielded better results.

Permeation studies

The methods developed by HPLC-DAD were finally used to determine the amount of antifungal permeated versus time (Figure 7.3) in a study of permeation through bovine hoof membranes. The gel had permeated much larger amounts of GOL than the traditional lacquer formulation. This result can be linked to the presence of acetylcysteine in the gel formulation that acts as a penetration enhancer. The molecular weight decreases in the following order for antifungals: MCZ > BTF > TBF > FLU > GOL. Thus, one can easily verify that the increased permeation is related to molecular weight reduction.

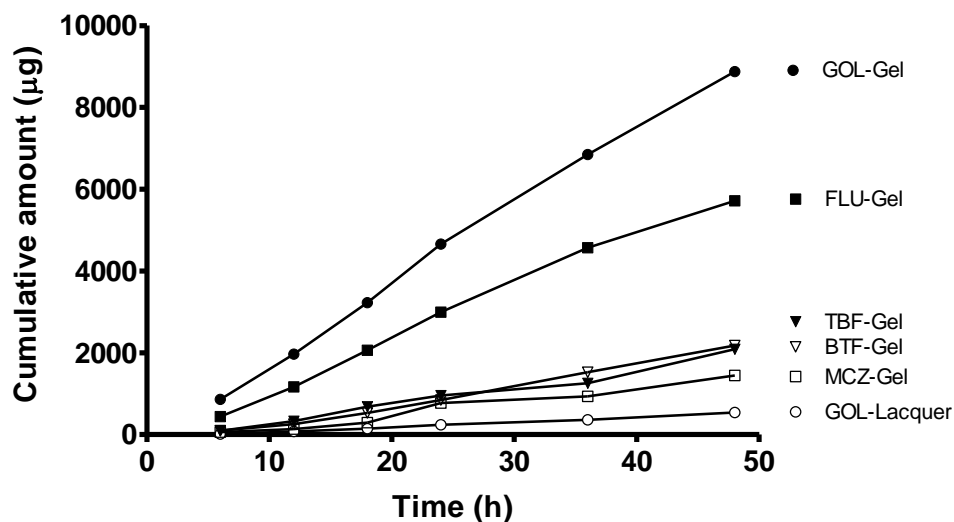


Figure 7.3. Cumulative amount of drug permeated through bovine hoof membranes versus time. Each point is the mean of four determinations.

Conclusion

The use of same chromatographic column (RP-18) was suitable for accurate quantification of all antifungals by HPLC-DAD. The robustness test was able to define the significant factors and the chromatographic parameters were well characterized. The statistical analysis was a valuable tool to understand and ensure reliable results. The analysis of multiple drugs allowed the establishment of acceptance limits for precision tests. Finally, the developed methods have proved to be suitable for application to a permeability study.

References

- [1] J. Ermer, J Pharm Biomed Anal, 24 (2001) 755-767.
- [2] J. Ermer, J.H. Miller, Method Validation in Pharmaceutical Analysis: A Guide to Best Practice, Wiley-VCH, 2005.
- [3] J. Ermer, H.J. Ploss, J Pharm Biomed Anal, 37 (2005) 859-870.
- [4] G.A. Shabir, Journal of chromatography. A, 987 (2003) 57-66.
- [5] Y. Vander Heyden, A. Nijhuis, J. Smeyers-Verbeke, B.G. Vandeginste, D.L. Massart, J Pharm Biomed Anal, 24 (2001) 723-753.

-
- [6] B. Dejaegher, Y.V. Heyden, *Journal of chromatography. A*, 1158 (2007) 138-157.
- [7] E. Hund, Y. Vander Heyden, D.L. Massart, J. Smeyers-Verbeke, *J Pharm Biomed Anal*, 30 (2002) 1197-1206.
- [8] D. Ozcan, D. Seckin, M. Demirbilek, *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology : JEADV*, 24 (2010) 1442-1446.
- [9] Z. Cetinkaya, N. Kiraz, S. Karaca, M. Kulac, I.H. Ciftci, O.C. Aktepe, M. Altindis, N. Kiyildi, M. Piyade, *European journal of dermatology : EJD*, 15 (2005) 258-261.
- [10] A.J. Carrillo-Munoz, C. Tur-Tur, D. Cardenes, F. Rojas, G. Giusiano, *Chemotherapy*, 58 (2012) 399-404.
- [11] K. Kokjohn, M. Bradley, B. Griffiths, M. Ghannoum, *International journal of dermatology*, 42 Suppl 1 (2003) 11-17.
- [12] C.S. Prasad, R. Shukla, A. Kumar, N.K. Dubey, *Mycoses*, 53 (2009) 123-129.
- [13] M.S. Khan, I. Ahmad, *Phytomedicine*, 19 (2011) 48-55.
- [14] M.S. Khan, I. Ahmad, *Applied microbiology and biotechnology*, 90 (2011) 1083-1094.
- [15] R. Baran, A. Kaoukhov, *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology : JEADV*, 19 (2005) 21-29.
- [16] D. Mertin, B.C. Lippold, *The Journal of pharmacy and pharmacology*, 49 (1997) 241-245.
- [17] D. Mertin, B.C. Lippold, *The Journal of pharmacy and pharmacology*, 49 (1997) 866-872.
- [18] L. Nogueiras-Nieto, M. Begona Delgado-Charro, F.J. Otero-Espinar, *Eur J Pharm Biopharm*, 83 (2013) 370-377.
- [19] V. Weisheimer, D. Miron, C.B. Silva, S.S. Guterres, E.E. Schapoval, *Pharmazie*, 65 (2010) 885-890.
- [20] E.P. Comission, *European Pharmacopoeia*, Council Of Europe : European Directorate for the Quality of Medicines and Healthcare, 2010.
-

8 CAPÍTULO V - ESTUDO DE PERMEAÇÃO

8.1 Introdução

Os estudos de permeação *in vitro* são ensaios para avaliação de novas formulações e fármacos e, atualmente, como rotina de controle de qualidade de produtos tópicos, especialmente, aqueles de aplicação sobre a pele. Para os produtos farmacêuticos de ação sistêmica são esperados coeficientes de permeação mais altos em comparação com os produtos tópicos que devem ficar retidos no tecido que foram aplicados.

As unhas são barreiras com grande resistência mecânica e química, sendo difíceis de serem transpostas. Membranas de cascos bovinos possuem composição similar às unhas e são empregadas como modelo *in vitro* para estudos de novas formulações. As grandes vantagens deste modelo são: a facilidade em obter cascos bovinos, a possibilidade de obter membrans com grande área que facilmente se ajustam as células de difusão convencionais e maior quantidade de fármaco permeado em menor tempo que reduz o tempo dos experimentos.

8.2 Resultados Preliminares

Os resultados preliminares do estudo de permeação demonstraram que o citral a 32 °C (temperatura de incubação das células de difusão) não tinha a estabilidade em etanol 70% verificada anteriormente a 6 °C. A adição de ácido ascórbico solucionou este problema. Porém, na presença de acetilcisteína (promotor de permeação com melhores resultados) novamente o citral não manteve-se estável o que acabou influenciando os cálculos relacionados a permeabilidade.

As formulações com citral interagem/reagem fortemente com a membrana de cascos bovinos deixando-as com coloração laranja-amarelada (Figura 8.1). Esteticamente, o resultado é muito ruim e simulação com cortes de unhas humanas mostraram efeito similar.

Assim, as formulações contendo citral não foram descritos no artigo a seguir, pois a degradação influenciou negativamente as estimas dos

parâmetros de permeação (fluxo e coeficiente de permeação, especialmente) e os resultados estéticos não são aceitáveis.

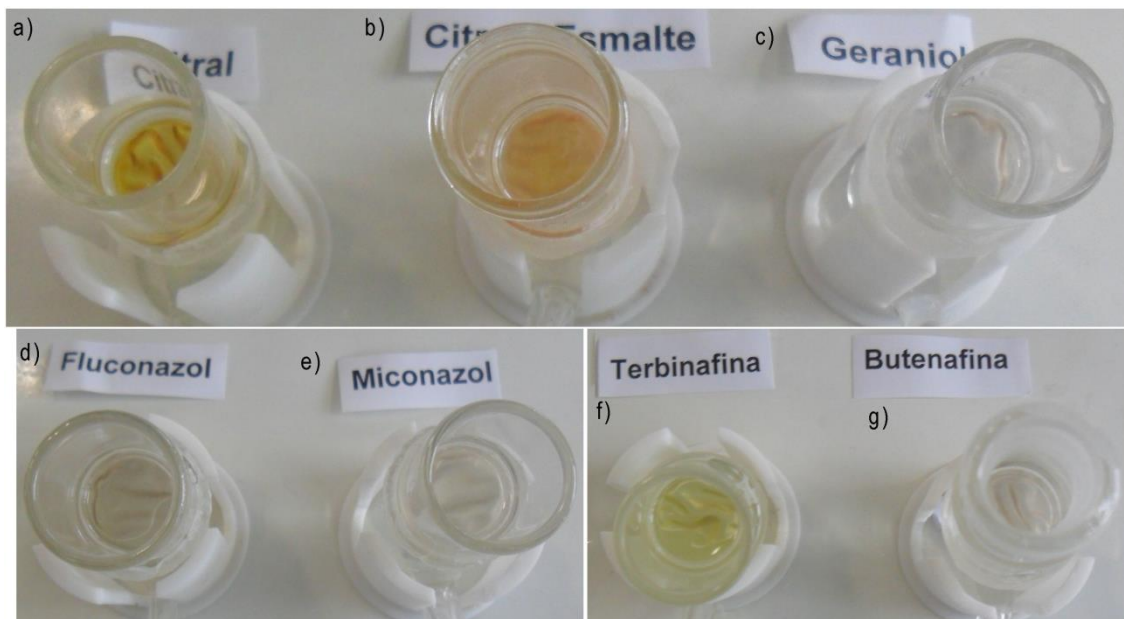


Figura 8.1. Fotografias das células de difusão e visualização da coloração das membranas após 48 h. Todas as imagens são em formulações gel, exceto por (b) que é esmalte. a) citral; b) citral – esmalte; c) geraniol; d) fluconazol; e) miconazol; f) terbinafina; g) butenafina.

8.3 Artigo

A seguir artigo que será submetido a revista *Pharmaceutical Research*. Este artigo descreve os resultados de permeação do geraniol na presença de diferentes promotores de absorção e de diferentes antifúngicos na formulação com melhores resultados de permeação.

Influence of Penetration Enhancers and Molecular Weight in Antifungals Permeation Through Bovine Hoof Membranes and Prediction of Efficacy in Human Nails

Abstract

This work aimed to evaluate the effect of different substances on the permeation of geraniol through bovine hoof membranes. Different penetration enhancers were able to increase the permeability up to 25 times compared to control. It was demonstrated that acetylcysteine in association with ascorbic acid increased the permeation, even in acid formulations. In addition, some antifungal drugs were incorporated into a gel formulation of HPMC containing acetylcysteine 5% and ascorbic acid 0.2% and then the permeation coefficient through bovine hoof membranes was evaluated. The relationship between permeability and molecular weight was established for fluconazole, miconazole, terbinafine, butenafine, geraniol and nerol. Geraniol and nerol, the antifungals with lower molecular weight, had the better permeability results. Permeability coefficients for nail plates were estimated and geraniol demonstrated similar or even better efficacy index values against *T. rubrum*, *T. menthagrophytes* and *M. canis* compared with terbinafine and miconazole.

Keyword: Fluconazole, miconazole, terbinafine, butenafine, geraniol, nerol, permeation, penetration enhancer, onychomycosis.

Introduction

Onychomycosis are fungal infections of the fingernails and toenails [1-3]. A survey among athletes in Europe and East Asia showed a prevalence of onychomycosis on the order of 26% and 22%, respectively [4]. In the United States the prevalence in the population was approximately 14% with higher rates in the elderly [3,5]. *Trichophyton rubrum*, a dermatophyte, is the most common species in toenails and *Candida spp* in fingernails. In women more fingernail infection occurs and in men more toenail infection [6].

Topical and oral formulations are still the medication of choice for treating onychomycosis. However, the oral regimen may take months to become effective and it requires large amounts of the drug in blood circulation to have a therapeutic concentration spot in the nails. The inefficiency of current

treatments demonstrates the need for a topical treatment that minimizes the systemic exposure to antifungal drugs [7,8]

The presence of keratin in the structure of the nail confers rigidity and impairs the permeability of drugs causing low concentrations in the nail bed [9]. The disruption of disulfide bonds of keratin by reducing agents, especially those containing thiol groups (acetylcysteine, 2-mercaptoethanol, thioglycolic acid, etc.), have demonstrated an excellent effect on permeation through the nail and bovine hoof [10-12].

Drug permeation studies can be performed using finely sliced bovine hooves in order to simulate the barrier effect of the human nail [13-19]. The main advantages of the model with bovine hooves are: easy to obtain, higher permeability (experiments in shorter time periods) and larger membranes that easily adapt to conventional diffusion cells.

Considering the similar characteristics of the nails and bovine hoof, Mertin and Lippold [14] proposed an equation describing the relationship between the permeability of a drug in human nails and bovine hooves. Although care must be taken in using this equation, it showed excellent correlation between the permeability coefficients of the nail and the hoof membranes ($r = 0.971$), which somehow validates the use of bovine hooves as an *in vitro* model for the initial tests of pharmaceutical formulations.

Nerol and geraniol are stereoisomers of a class of substances known as monoterpenes and have great antifungal activity against dermatophytes [20,21]. Due to their low molecular weight their permeability was tested against classical antifungal drugs.

This work aimed to evaluate the effect of different substances as penetration enhancers of geraniol through membranes of bovine hoof. The influence of pH and increasing concentrations of acetylcysteine were also investigated. The permeability of several antifungal drugs was established and its relationship to their molecular weights was defined in formulations containing acetylcysteine and ascorbic acid. Finally, minimum inhibitory concentrations against *T. rubrum*, *T. menthagrophytes* and *M. canis* were determined by CLSI reference methods [22] and the permeability coefficients for nail plates were

estimated to calculate efficacy index values to compare GOL and NOL with the classical antifungal drugs.

Materials and Methods

Materials

Geraniol (GOL), nerol (NOL), citral (CIT), N-acetyl-L-cysteine (AC) and panthenol (PAN) were purchased from Sigma Co (St Louis, MO, USA). Terbinafine hydrochloride (TBF), fluconazole (FLU) and ascorbic acid (AA) were kindly supplied by Cristalia[®] (São Paulo, Brazil). Miconazole (MCZ) and Butenafine hydrochloride (BTF) were kindly supplied by Brazilian Pharmacopoeia (Santa Maria, Brazil) and Brainfarma Co (Rio de Janeiro, Brazil), respectively. Methocel[®] F4M (HPMC) was supplied by Colorcon (Cotia, Brazil). All reagents were analytical or HPLC grade. Acetonitrile and methanol were purchased from Tedia Co (Fairfield, USA), the ethanol and triethylamine from Merck Co (Darmstadt, Germany). Purified water was obtained by a Millipore[®] Direct-Q 3UV with pump (Molsheim, France).

Drug Formulations

Different formulations using HPMC as viscosity agent were evaluated. HPMC gel 3% (w/v) in ethanol 70% was prepared under magnetic stirring and heating (70 °C). The gel base obtained was translucent and consistent.

Formulations containing GOL 2% were prepared adding 50% of gel base, antioxidant (AO), penetration enhancers and the mass adjusted with ethanol 70% (Table 8.1). All percentages are given as w/w in relation to total weight formulation.

Table 8.1. Content of pharmaceutical adjuvants in formulations containing GOL 2%.

Formulation	Penetration enhancer (%)	Antioxidant (%)
Control	-	-
Control AO	-	AA 0.2%
AC2.5%	Acetylcysteine 2.5%	AA 0.2%
AC5%	Acetylcysteine 5%	AA 0.2%
AC5% pH6	Acetylcysteine 5%	AA 0.2%
AC5%+U10%	Acetylcysteine 5% + urea 10%	AA 0.2%
AC10%	Acetylcysteine 10%	AA 0.2%
CIT5%	Citral 5%	AA 0.2%
PAN10%	Panthenol 10%	AA 0.2%
DMSO10%	DMSO 10%	AA 0.2%
Lipo-Lacquer	-	-

AA – ascorbic acid.

Lipo-Lacquer was prepared adding 50% of lacquer base (Colorama® Lóreal, Rio de Janeiro – Brazil), GOL 2% and the weight adjusted with ethanol.

Aqueous solutions of 20% (w/v) of all formulations had a pH ranging from 3.25 to 3.70, except for formulation AC5%pH6 which had its pH adjusted with sodium hydroxide 2 M.

After permeation enhancement studies, formulations of antifungals (GOL, NOL, FLU, MIC, TBF and BTF) were prepared at 2% in 50% gel base, 5% AC, 0.2% AA and the weight adjusted with ethanol 70%. Afterwards, the formulations were submitted to the permeation studies.

Preparation of the Bovine Hoof Membranes

Hooves were taken from freshly slaughtered cattle, stripped of adhering cartilaginous and connective tissue and put into ethanol 70% (v/v) for 24 h. Ethanol 70% was used because Khengar *et al.*(2007) found no change in swelling / hydration of nails in ethanol 70% compared to water. Ethanol 70% has the advantage of being a good preservative. About 200 μm thick sections were taken from the bottom of the hoof with a microtome (Reichert Vienna, Austria) with the knife positioned at six degrees. The sections were punched with a 12 mm diameter. Careful visual inspection was carried out looking for pores or any discontinuity. The hoof membranes obtained were maintained in ethanol 70%. The thickness of the swollen membranes was measured with a digital micrometer (Mitutoyo, Tokyo, Japan).

Permeation Studies

The hoof membrane was inserted into the diffusion cell (effective diffusion area 2.5 cm^2). The acceptor compartment was then filled (10 mL) with a solution containing 0.2% AA in ethanol 70% (acceptor media). The cells were equilibrated at 32°C in a water bath and maintained under magnetic stirring. Approximately, 2 mL of each formulation (mean formulation viscosity of 2922 cP at 25 °C) were deposited on the upper hoof membrane surface and 1.0 mL samples were taken from the acceptor media at 6, 12, 18, 24, 36 and 48 h in order to determine the amount of drug permeated. The acceptor compartment was immediately filled with 1.0 mL of fresh acceptor media.

Analytical methods

The samples were filtered through teflon filter (Millipore® - 0.45 μm) before injection into HPLC. Analysis were performed in a Shimadzu (Kyoto, Japan) HPLC consisting of a pump system (LC-20AT), a diode array detector (SPD-10A), a system controller (CBM-20A), an auto injector (SIL-20A), an oven (CTO-20A) set at 25 °C, and Phenomenex® (Torrance, CA, USA) Synergi Fusion C18 column (250 mm x 4,0 mm, 4 μm). The volume injected was 20 μL and the samples were diluted when necessary. Standard curves with five

concentrations ranging from 1 to 100 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ were employed for each drug analyzed. The chromatographic conditions are described in Table 8.2.

Table 8.2. Chromatographic conditions.

Drug	Mobile Phase	Flow rate ($\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$)	WL (nm)
GOL, NOL	ACN:Water (52:48)	1.2	210
FLU	MetOH: ACN: NH_4^+Ac buffer 6.5 mM (30:15:55)	1.0	210
MIC	ACN: Triethylamine 0,3% pH 5.0 (82:18)	1.2	225
TBF, BTF	ACN: Triethylamine 0,3% pH 5.0 (85:15)	1.2	282

WL – wavelength; MetOH – methanol; ACN – acetonitrile; NH_4^+Ac – ammonium acetate.

Microdilution assay

Minimal inhibitory concentration (MIC) values were determined by broth microdilution using the twofold dilution method according to the CLSI guidelines with RPMI-MOPS [22]. The clinical isolates of *T. rubrum*, *T. menthagrophytes* and *M. canis* were obtained from the culture collections of the Laboratory of Applied Mycological Research – Pharmacy School - Federal University of Rio Grande do Sul. GOL, NOL, MCZ and TBF were tested in the range of 0.25 to 128 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$. These results were employed to calculate the efficacy index.

Results and Discussion

Influence of Different Enhancers on GOL Permeability

The permeability coefficients (P) were estimated from the slope of a plot of the cumulative penetrating amount of GOL per time. Distinct time periods were used to calculate P for each formulation, because there is great variability in lag time and, in some cases, the flux rates (J) became constant after 18 h (e.g., control). Ascorbic acid (AA), used primarily as an AO agent, even at a low

concentration (0.2%), showed a significant difference for GOL permeation compared with control (Fig. 8.2). AA probably acts as a disulfide bond reductant cleaving the ternary structure of keratin improving drug permeability [23,24]. The antifungal activity of some volatile oils presents synergism and, for this reason, CIT was added to test its influence on GOL permeation. Nevertheless, Citral, as panthenol and DMSO had no effect beyond an increase caused by AA.

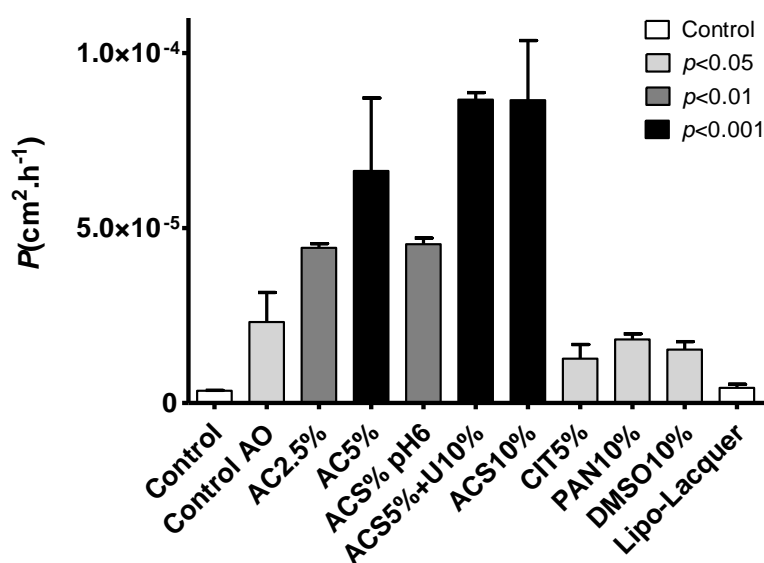


Figure 8.2. Permeability coefficient of GOL (mean + sd, n =4) for formulations with different penetration enhancers through bovine hoof membranes. Statistical analysis was performed comparing the control against the other using Dunnett's post-test.

Formulations with pH around 3.5 and acetylcysteine (AC) concentration of 5% or more exhibited the best results. Among these formulations there is a positive correlation between the concentration of AC and permeability, and AC10% shows a greater result. This formulation increased the permeability of geraniol 25 times compared to control. Urea has a demonstrable effect. It probably softens and swells the hoof membranes, and its association with AC5% showed results very similar to formulation AC10%. AA and AC are used as reactants in the cleavage of disulfide bonds at neutral or basic pH (range 7.2 to 9.0) [17, 23-35]. Although, there was greater permeability of GOL in lower pH

(formulation AC5% pH 3.35 had 46% greater permeability than the same formulation with pH 6.0) showing that AA and AC also have an effect on acid pH. The nails and hooves are theoretically considered as hydrophilic gels [26-27]. It was shown that the maximum flow is independent of the vehicle lipophilicity and, in our study, similar permeability results between the control and lipo-lacquer confirm this rule [15]. It is also known that the pH influences the solubility of acids and bases and could alter the saturation concentration of the drug in the vehicle. However, GOL can be considered a neutral molecule and the increasing permeability observed in pH 3.35 could only be due to changes caused in the effects of AA and AC as penetration enhancers.

Influence of Different Enhancers on the Lag Time Phase of GOL

The lag time was calculated from the intercept of the simple linear regression of the cumulative amount of drug permeated vs time. Fig. 8.3 illustrates the lag time of GOL from the formulations tested through hoof membranes. The control showed a longer lag time than formulations containing AA. Mertin and Lippold (1997) reported long lag times in a study testing chloramphenicol permeability through human nails [13]. The two formulations tested showed similar permeabilities, but the lag times were quite different (200 and 400 h) and the authors concluded that reduction of time to obtain steady state flux of drug is critical for *in vivo* efficacy.

In our study, the association of AA and AC5% led to negative lag times for GOL (mean of -5.05 h). This result has no physical meaning, but in practical terms indicates that the association of AA and AC5% significantly reduces the lag time phase. The formulations AC5%+U10% and AC10%, which showed higher permeability, had mean lag times of 3.74 and 2.05 h, respectively. Additionally, we note that the flux of GOL is approximately constant since the first sampling point (6 h) for formulation AC5%. However, formulations AC5%+U10% and AC10% required more time for the flux reach the steady-state. There was no further investigation but Nogueiras-Nieto *et al.* [28] discussed the importance of water on AC effects as penetrating enhancers of nails and hooves. The authors reported that AC treatment reduces disulfide links facilitating water diffusion and water-protein bonding which disrupts the

structure of nail and hoof creating new pores and increasing permeability. Therefore, it can be assumed that the increased permeability is a balance between the amount of AC (to reduce the disulfide bonds) and water (to stabilize the pores). The low water concentration and high levels of solute in the formulations AC5%+U10% and AC10% can slow down the hydration of the membrane and increase the lag time phase. For this reason, other formulations used 5% AC as penetrating enhancer.

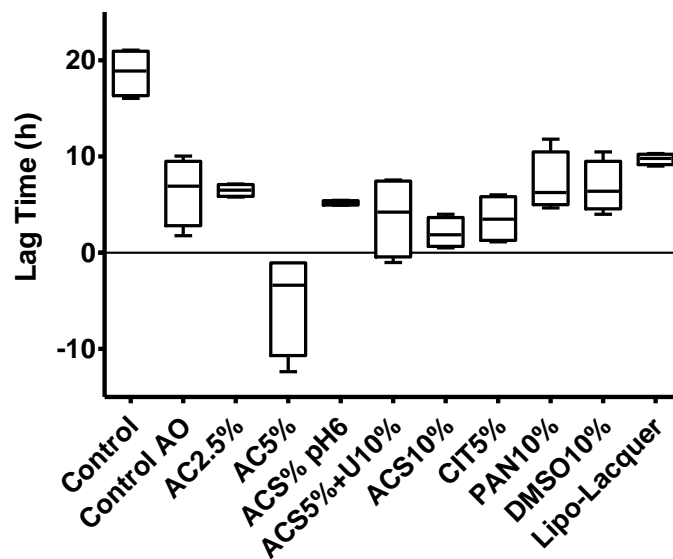


Figure 8.3. Box Plot of GOL Lag time for formulations with different penetration enhancers through bovine hoof membranes (n = 4).

Determining the Influence of Molecular Weight on the Permeability of Antifungals

Kobayashi *et al.* [29] show the relationship between permeation through the human nail and the molecular weight using Eq. (1):

$$\log P = \log \left(\frac{D_0}{h} \right) - \beta' MW \quad (1)$$

where P is the permeability coefficient, D_0 is the diffusivity of a hypothetical molecule having zero molecular weight, h represents the membrane thickness, β' is a constant and MW represents the molecular weight.

Fig. 8.4 illustrates the relationship between permeability through bovine hooves and molecular weight (Table 3) of six substances with antifungal activity from three classes of drugs (imidazoles, allylamines and monoterpenes). The simple linear regression applied to data was statistically significant ($p < 0.001$), the slope (β') and the intercept ($\log(D_0/h)$) being 0.00257 and -3.805, respectively. The strong inverse correlation between $\log P$ and MW ($r = -0.976$) shows that the permeability of drugs can be predicted accurately by their molecular weight.

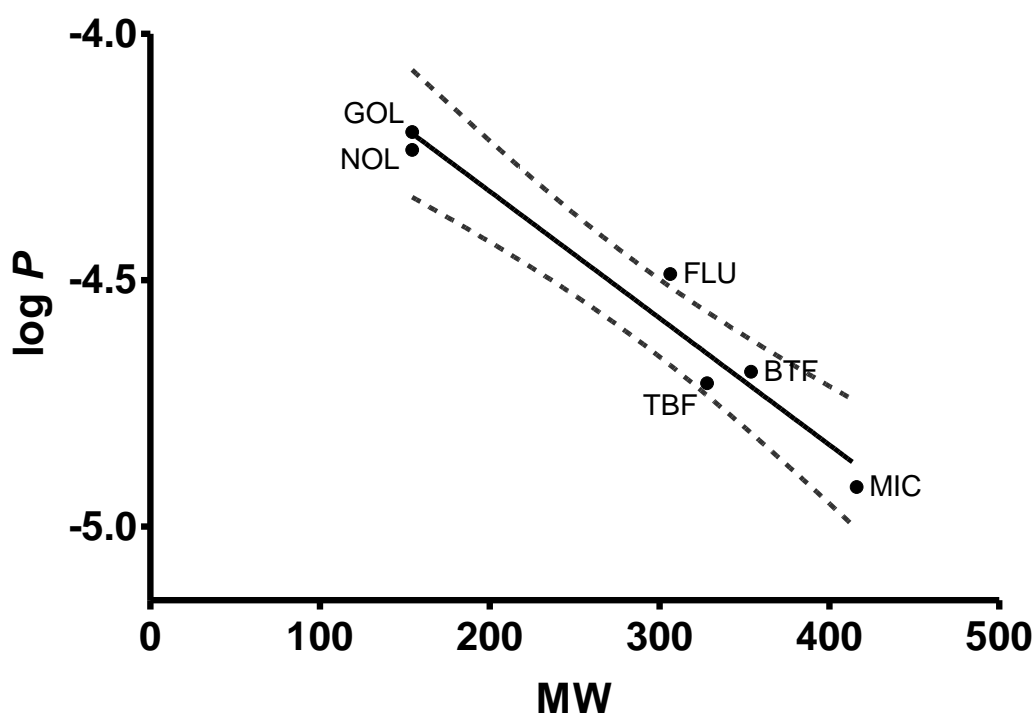


Figure 8.4. Relationship between the permeability coefficient (P) and de molecular weight (MW) for a series of antifungal drugs. Each value represents the mean of four determinations. The dotted line represents the 95% confidence interval of the regression line.

It should be noted that the antifungals tested in our study have AC5% in the formulation as permeation enhancer. It can be stated that the use of AC increases permeability through hoof membranes, but the size of the molecule still determines the amount of drug permeated. Similar relations are expected for human nails [14] and the use of low molecular weight antifungal is an

alternative to enhance topical treatments of onychomycosis which generally are ineffective. Nogueiras-Nieto *et al.* (2011) described the cause of the increased permeability in bovine hoof compared to human nails employing methods to determine pore diameter (mercury porosimetry and scanning electron microscopy) [28]. In this study, it was found that the distribution of pore diameters on both types of membranes (nail and hoof) is similar (average of approximately 10 μm), but the bovine hoof membrane has more pores per unit of area ("more leaked"). In addition, factors such as moisture and the presence of permeation enhancer demonstrated that they do not increase the mean pore diameter. However, an increasing number of pores were observed when the membranes were pretreated with acetylcysteine.

Kobayashi *et al.*(2004) found that drugs in non-ionic form are able to permeate 10 times more through the nail plate than ionized drugs [29]. The authors associated this result with a small increase in the apparent molecular weight due to ion hydration. However, in our study, the correlation between permeability and molecular weight was established for non-ionized (GOL and NOL) and ionized (FLU, MCZ, TBF and BTF) molecules without distinction. The difference between these studies is the type of membrane used (nail plates or bovine hooves). To obtain the membranes, the bovine hooves were sliced and the inner layers used. The nail plate was used intact, washed and pretreated with phosphate buffer. It is known that the layers of the ventral and dorsal nail are less thick and containing more lipids, increasing lipid:weigh ratio [30]. The behavior observed by Kobayashi is compatible with the permeation properties of the stratum corneum (rich in lipids) [31]. It can be considered that the nail has thin layers that behave like the stratum corneum and therefore drug ionization is important.

Flux and Lag Time Phase for antifungals in a formulation containing 5% of AC

The flux (J) of a solute can be defined as the mass of molecules (m) moving through a given crosssectional area (A) during a given period of time (t) (Equation 2):

$$J = \frac{dm}{dt A} \quad (2)$$

Medications that enhance the flux of the drug through the nail are desired. However, the time to reach the maximum flux is usually a problem and it appears that in most of the contact time of the formulation with the nail the flux of the drug is low [13, 19, 32]. The time to achieve effective antifungal concentrations in the deeper layers of the nail is critical to the efficacy and adherence to treatment. Table 8.3 shows that the presence of AC 5% in the formulation maintains the values of lag time negatives for the low molecular weight drugs. The lag time negative, mathematically, is due to the fact that in the first sampling point (6 h), drugs like GOL, NOL and FLU have high amounts permeated and flux has already reached the steady state (Fig. 8.5). The lag time rapidly increases with increasing molecular weight. It can be seen that the flux variation in these cases is higher, particularly for miconazole (relative standard deviation (RSD) = 45%), which is the larger molecule. Hence, the use of AC 5% as penetrating enhancer and drugs with low molecular weight shows up as an option to improve the efficacy of topical treatments against onychomycosis.

Table 8.3. Molecular weights (MW), Lag Time and Flux (J) of antifungals in gel formulation containing AC 5% through bovine hoof membranes ($h = 200 \mu\text{m}$, $A = 2.5 \text{ cm}^2$).

Drug	MW	Lag Time Phase (h)		$J (\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}\cdot\text{h}^{-1})$	
		Mean ^a	sd	Mean ^a	Sd
Geraniol	154.25	-5.1	2.6	67.4	11.9
Nerol	154.25	-3.6	1.9	62.5	9.8
Fluconazole	306.27	-2,4	1.8	47.4	15.3
Miconazole	416.13	6.9	3.9	12.9	5.8
Terbinafine.HCl	327.89	3.7	2.8	18.7	6.3
Butenafine.HCl	353.93	3.3	1.8	19.7	7.2

^a $n = 4$.

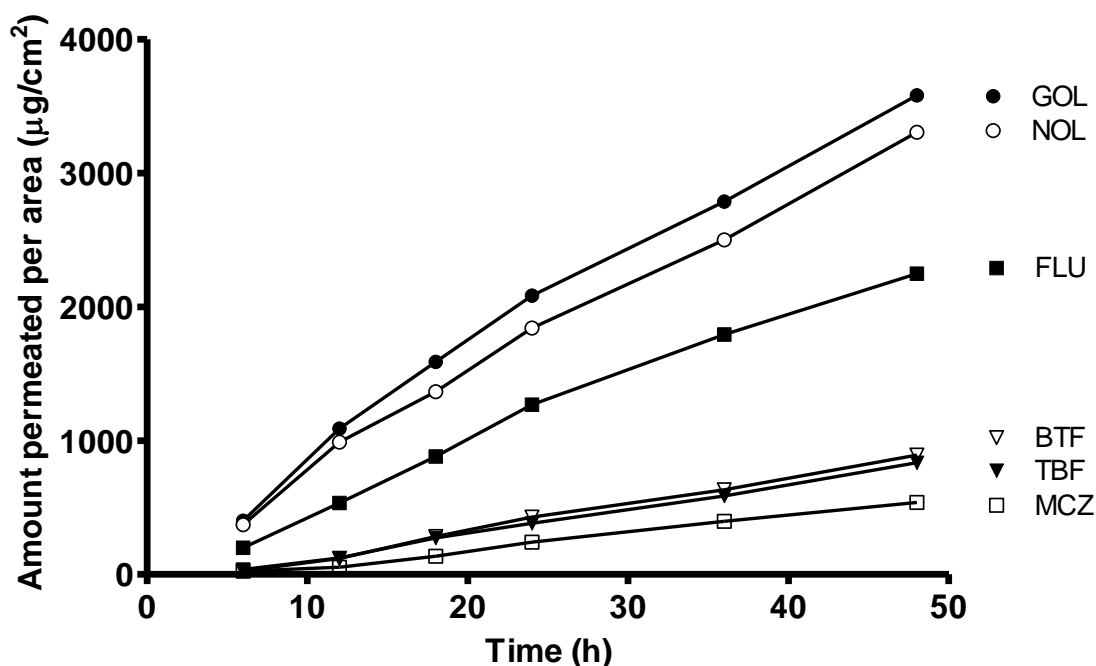


Figure 8.5. Cumulative amount of drug permeated per cross-sectional area through bovine hoof membranes versus time. Each point is the mean of four determinations.

Prediction of the topical efficacy of antifungal drugs

Mertin and Lippold (1997) introduced the concept of efficacy (E) in studies of permeation through the relationship between flux (J) and minimum inhibitory concentration (MIC) [14]. It was assumed that the therapeutic efficacy is proportional to the concentration available at the site of action which depends on the flux and the reciprocal of MIC (Equation 3).

$$E = \frac{J}{MIC} \quad (3)$$

Kobayashi *et al.* [29] established the relationship between permeability and molecular weight of drugs through nail plate for ionized and non-ionized drugs (Table 8.4). The coefficient of permeability can be obtained from these equations if the molecular weight of the drug is known. The drug flux through the nail can then be calculated using the relationship of equation 4.

$$J = \frac{dm}{dt A} = P C_v \quad (4)$$

where C_v is the drug concentration of drug formulation/vehicle (the value of this parameters was fixed in 20000 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ or 2%, because its was the antifungal drugs concentration in the gel formulations).

The MIC values were obtained in a previously experiment designed to measure the potency of GOL and NOL against dermatophytes. MCZ and TBF were used as positive controls in this study. *T. rubrum* and *T. menthagrophytes* were choosed because they are the most common pathogens infecting toenails. *M. canis* was selected due to its great prevalence in domestic animals and, consequently, can potencilally infect humans.

Table 8.4. Values for permeability and flux through the nail plate estimated from the equations of kobayashi *et al.*

Equation	$\log P_{non} = -0.00856MW - 5.260$		$\log P_{ion} = -0.0103MW - 5.907$	
	P (cm.s ⁻¹)	J ($\mu\text{g.cm}^{-2}.\text{s}^{-1}$)	P (cm.s ⁻¹)	J ($\mu\text{g.cm}^{-2}.\text{s}^{-1}$)
GOL	$2.63.10^{-7}$	$5.26.10^{-3}$	MCZ	$1.51.10^{-9}$ $3.01.10^{-5}$
NOL	$2.63.10^{-7}$	$5.26.10^{-3}$	TBF	$8.58.10^{-9}$ $1.72.10^{-4}$

The estimated permeability coefficients through the nail for GOL and NOL exhibited values 30 and 175 times larger than TBF and MCZ, respectively. As expected, the differences of permeability across the nail are accentuated due to the differences in molecular weight. In bovine hoof membranes the permeability of GOL was 3.2 and 5.2 times larger than TBF and MCZ, respectively.

GOL has higher MIC values and hence is less potent against dermatophytes than TBF and MCZ (Figure 8.6). Due to its greater flux, GOL equals or even surpasses TBF and MCZ in terms of efficacy. For *T. rubrum*, the efficacy index of GOL was 2.4 times greater than MCZ and for *M. canis* GOL

was 35% higher than TBF. The GOL efficacy index against *T. menthagrophytes* was similar to TBF and 2.2 times higher than MCZ.

The fact that the efficacy index was advantageous for GOL does not necessarily imply equivalent or superior efficacy *in vivo*. However, it was demonstrated that antifungals with lower molecular weight are potential drugs for the treatment of onychomycosis.

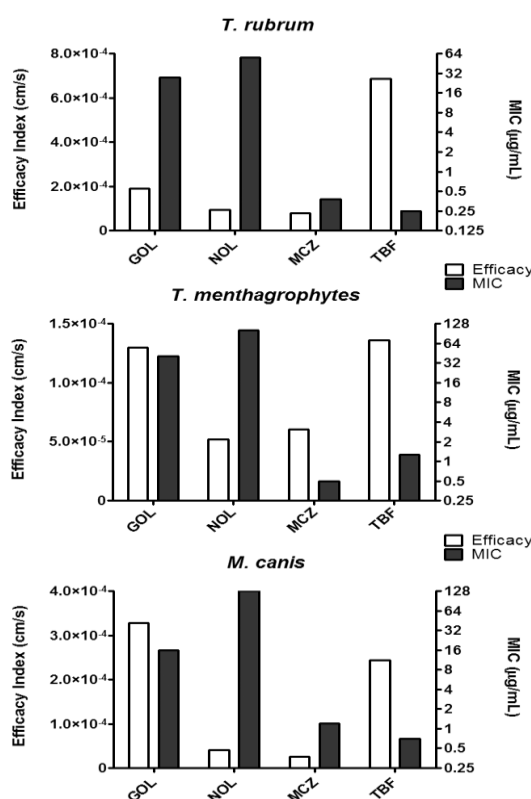


Figure 8.6. MIC and Efficacy Index prediction of antifungals against dermatophytes. MIC results are represented as geometric mean. a) *T. rubrum* (n = 5); b) *T. menthagrophytes* (n = 3); c) *M. canis* (n = 4).

Conclusions

This study demonstrated that there is an inverse relationship between the logarithm of permeability through bovine hoof membranes and molecular weight. In addition, **AC at 5%** showed to be an excellent penetration enhancer and also reduces the lag time phase. The efficacy index for nail plate was calculated and demonstrated the potential of geraniol and low molecular weight substances as antifungals for the treatment of onychomycosis.

References

1. T.R. Einarson, A.K. Gupta, N.H. Shear, and S. Arikian. Clinical and economic factors in the treatment of onychomycosis. *Pharmacoeconomics*. 9:307-320 (1996).
2. M.A. Repka, P.K. Mididoddi, and S.P. Stodghill. Influence of human nail etching for the assessment of topical onychomycosis therapies. *Int J Pharm*. 282:95-106 (2004).
3. J. Thomas, G.A. Jacobson, C.K. Narkowicz, G.M. Peterson, H. Burnet, and C. Sharpe. Toenail onychomycosis: an important global disease burden. *Journal of clinical pharmacy and therapeutics*. 35:497-519 (2010).
4. R. Caputo, K. De Boule, J. Del Rosso, and R. Nowicki. Prevalence of superficial fungal infections among sports-active individuals: results from the Achilles survey, a review of the literature. *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology : JEADV*. 15:312-316 (2001).
5. M.A. Ghannoum, R.A. Hajjeh, R. Scher, N. Konnikov, A.K. Gupta, R. Summerbell, S. Sullivan, R. Daniel, P. Krusinski, P. Fleckman, P. Rich, R. Odom, R. Aly, D. Pariser, M. Zaiac, G. Rebell, J. Leshner, B. Gerlach, G.F. Ponce-De-Leon, A. Ghannoum, J. Warner, N. Isham, and B. Elewski. A large-scale North American study of fungal isolates from nails: the frequency of onychomycosis, fungal distribution, and antifungal susceptibility patterns. *Journal of the American Academy of Dermatology*. 43:641-648 (2000).
6. J.R. Nazar, P.E. Gerosa, and O.A. DIAZ. Onychomycosis: epidemiology, causative agents and assessment of diagnostic laboratory methods. *Rev Arg Microb*. 44:21-25 (2012).
7. R. Baran, A. Tosti, I. Hartmane, P. Altmeyer, J. Hercogova, V. Koudelkova, T. Ruzicka, P. Combemale, and I. Mikazans. An innovative water-soluble biopolymer improves efficacy of ciclopirox nail lacquer in the management of onychomycosis. *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology : JEADV*. 23:773-781 (2009).
8. R. Baran and A. Kaoukhov. Topical antifungal drugs for the treatment of onychomycosis: an overview of current strategies for monotherapy and

combination therapy. *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology : JEADV*. 19:21-29 (2005).

9. M.B. Brown, R.H. Khengar, R.B. Turner, B. Forbes, M.J. Traynor, C.R. Evans, and S.A. Jones. Overcoming the nail barrier: A systematic investigation of unguinal chemical penetration enhancement. *Int J Pharm*. 370:61-67 (2009).
10. Y. Kobayashi, M. Miyamoto, K. Sugibayashi, and Y. Morimoto. Enhancing effect of N-acetyl-L-cysteine or 2-mercaptoethanol on the in vitro permeation of 5-fluorouracil or tolinaftate through the human nail plate. *Chem Pharm Bull (Tokyo)*. 46:1797-1802 (1998).
11. G.G. Malhotra and J.L. Zatz. Investigation of nail permeation enhancement by chemical modification using water as a probe. *Journal of pharmaceutical sciences*. 91:312-323 (2002).
12. K.A. Walters, H.M. Abdalghafor, and M.E. Lane. The human nail--barrier characterisation and permeation enhancement. *Int J Pharm*. 435:10-21 (2012).
13. D. Mertin and B.C. Lippold. In-vitro permeability of the human nail and of a keratin membrane from bovine hooves: penetration of chloramphenicol from lipophilic vehicles and a nail lacquer. *The Journal of pharmacy and pharmacology*. 49:241-245 (1997).
14. D. Mertin and B.C. Lippold. In-vitro permeability of the human nail and of a keratin membrane from bovine hooves: prediction of the penetration rate of antimycotics through the nail plate and their efficacy. *The Journal of pharmacy and pharmacology*. 49:866-872 (1997).
15. D. Mertin and B.C. Lippold. In-vitro permeability of the human nail and of a keratin membrane from bovine hooves: influence of the partition coefficient octanol/water and the water solubility of drugs on their permeability and maximum flux. *The Journal of pharmacy and pharmacology*. 49:30-34 (1997).
16. R.H. Khengar, S.A. Jones, R.B. Turner, B. Forbes, and M.B. Brown. Nail swelling as a pre-formulation screen for the selection and optimisation of unguinal penetration enhancers. *Pharmaceutical research*. 24:2207-2212 (2007).

17. Lusiana, S. Reichl, and C.C. Muller-Goymann. Keratin film made of human hair as a nail plate model for studying drug permeation. *Eur J Pharm Biopharm.* 78:432-440 (2011).
18. D. Monti, L. Saccomani, P. Chetoni, S. Burgalassi, S. Tampucci, and F. Mailland. Validation of bovine hoof slices as a model for infected human toenails: in vitro ciclopirox transungual permeation. *The British journal of dermatology.* 165:99-105 (2011).
19. L. Nogueiras-Nieto, M. Begona Delgado-Charro, and F.J. Otero-Espinar. Thermogelling hydrogels of cyclodextrin/poloxamer polypseudorotaxanes as aqueous-based nail lacquers: Application to the delivery of triamcinolone acetonide and ciclopirox olamine. *Eur J Pharm Biopharm.* 83:370-377 (2013).
20. C.S. Prasad, R. Shukla, A. Kumar, and N.K. Dubey. In vitro and in vivo antifungal activity of essential oils of *Cymbopogon martini* and *Chenopodium ambrosioides* and their synergism against dermatophytes. *Mycoses.* 53:123-129 (2009).
21. G.B. Zore, A.D. Thakre, V. Rathod, and S.M. Karuppayil. Evaluation of anti-Candida potential of geranium oil constituents against clinical isolates of *Candida albicans* differentially sensitive to fluconazole: inhibition of growth, dimorphism and sensitization. *Mycoses.* 54:e99-109 (2011).
22. C.a.L.S.I. (CLSI). Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of Filamentous Fungi. Approved standard CLSI M38-A2., Vol. M38-A2, C.L.S.I., Wayne, PA, US., 2008.
23. L.M. Landino, M.T. Koumas, C.E. Mason, and J.A. Alston. Ascorbic acid reduction of microtubule protein disulfides and its relevance to protein S-nitrosylation assays. *Biochemical and biophysical research communications.* 340:347-352 (2006).
24. D. Giustarini, I. Dalle-Donne, R. Colombo, A. Milzani, and R. Rossi. Is ascorbate able to reduce disulfide bridges? A cautionary note. *Nitric oxide : biology and chemistry / official journal of the Nitric Oxide Society.* 19:252-258 (2008).

25. T. Kitahara and H. Ogawa. The extraction and characterization of human nail keratin. *Journal of dermatological science*. 2:402-406 (1991).
26. K.A. Walters, G.L. Flynn, and J.R. Marvel. Physicochemical characterization of the human nail: permeation pattern for water and the homologous alcohols and differences with respect to the stratum corneum. *The Journal of pharmacy and pharmacology*. 35:28-33 (1983).
27. K.A. Walters, G.L. Flynn, and J.R. Marvel. Physicochemical characterization of the human nail: solvent effects on the permeation of homologous alcohols. *The Journal of pharmacy and pharmacology*. 37:771-775 (1985).
28. L. Nogueiras-Nieto, J.L. Gomez-Amoza, M.B. Delgado-Charro, and F.J. Otero-Espinar. Hydration and N-acetyl-l-cysteine alter the microstructure of human nail and bovine hoof: implications for drug delivery. *Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society*. 156:337-344 (2011).
29. Y. Kobayashi, T. Komatsu, M. Sumi, S. Numajiri, M. Miyamoto, D. Kobayashi, K. Sugibayashi, and Y. Morimoto. In vitro permeation of several drugs through the human nail plate: relationship between physicochemical properties and nail permeability of drugs. *European journal of pharmaceutical sciences : official journal of the European Federation for Pharmaceutical Sciences*. 21:471-477 (2004).
30. S. Murdan. Drug delivery to the nail following topical application. *Int J Pharm*. 236:1-26 (2002).
31. X. Li and B.R. Jasti. *Design of controlled release drug delivery systems*, McGraw-Hill, New York, 2006.
32. Y. Myoung and H.K. Choi. Permeation of ciclopirox across porcine hoof membrane: effect of pressure sensitive adhesives and vehicles. *European journal of pharmaceutical sciences : official journal of the European Federation for Pharmaceutical Sciences*. 20:319-325 (2003).

9 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O Capítulo I apresenta o artigo publicado (Anexo - Revista *Current Pharmaceutical Analysis*) desta tese, intitulado *Spectrophotometric Simultaneous Determination of Citral Isomers in Cyclodextrin Complexes with Partial Least Squares Supported Approach*. O trabalho foi concebido e realizado durante a Disciplina de Métodos Quantitativos do Pós-Graduação da Engenharia da Produção – UFRGS que foi realizada, no segundo semestre de 2009, sob supervisão da Profa. Dra. Carla Caten.

Este artigo descreve o desenvolvimento e otimização de método por espectrofotometria no UV associado à técnica dos Mínimos Quadrados Parciais (PLS) para quantificação dos isômeros do citral. O PLS é uma técnica complexa e potente para relacionamento de variáveis que possuem correlação. O emprego do Desenho Composto Central (CCD) associado a Análise de Superfície de Resposta (RSM) foi útil para otimização do método empregando o Erro Padrão Relativo da Predição (RSEP) como resposta. Os resultados obtidos foram satisfatórios para quantificação dos isômeros em misturas e permitiram a análise e caracterização de amostras de citral complexadas com ciclodextrinas. O complexo do citral com β -ciclodextrina apresentou maior percentual de inclusão do óleo. Considerando que o citral degrada rapidamente em água e que as ciclodextrinas protegem fármacos e melhoram a solubilidade, pode-se considerar o complexo citral- β -ciclodextrina como uma alternativa no caso de se optar por preparar formulação aquosa. Além disso, este trabalho viabilizou a obtenção de soluções purificadas dos isômeros em torno de $30 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ que posteriormente foi otimizado para obtenção de concentrações mais elevadas que foram empregadas nos ensaios microbiológicos de atividade antifúngica.

O Capítulo II descreve os resultados obtidos no ensaio microbiológico por microdiluição para avaliação da atividade antifúngica dos isômeros do citral, além de geraniol e nerol. Estudo preliminar apresentou boa atividade do citral contra dermatófitos e, além disso, demonstrou que os complexos do citral com ciclodextrinas não foram capazes de manter o mesmo efeito. Assim, a estratégia de melhorar as propriedades físico-químicas do citral através de microencapsulação foi descartada. Estes resultados foram obtidos no Laboratório de Fungos Patogênicos do Instituto de Ciências Básicas –

UFRGS sob a supervisão da Profa. Dra. Maria Lúcia Scroferneker e auxílio prático da, então doutoranda, Tatiane Caroline Daboit e resultaram em apresentação oral no VI Congresso Brasileiro de Micologia ocorrido em novembro de 2010 em Brasília (resumo e certificado – Anexo).

O artigo resultante deste estudo foi intitulado *Antifungal Activity and Mechanism of Action of Monoterpenes Against Dermatophytes and Yeasts*. Este trabalho foi executado em parceria com o Laboratório de Micologia da Faculdade de Farmácia – UFRGS com supervisão do Professor Dr. Alexandre Fuentefria e auxílio prático de seus colaboradores.

Neste estudo, se verificou que os dermatófitos são mais suscetíveis aos monoterpenos que as leveduras. Os resultados permitiram determinar que os isômeros trans (forma *Z*) são mais ativos, embora os isômeros cis (forma *E*) também possuam atividade antifúngica. Citral e geraniol tiveram boa atividade contra dermatófitos. Estudos sobre o mecanismo de ação indicam que os monoterpenos agem alterando a estrutura da membrana, pois interagem com o ergosterol.

O Capítulo III descreve a validação de método analítico por LC-UV para quantificação dos isômeros do citral em creme contendo 3% de citral. Além disso, este capítulo caracteriza a estabilidade dos isômeros do citral em meio aquoso, em solventes orgânicos e em creme. O teste de robustez deste estudo de validação de método analítico foi apresentado na forma de pôster no *36th International Symposium on High-Performance Liquid Phase Separations and Related Techniques* realizado em junho de 2011 em Budapeste – Hungria (certificado - Anexo).

O método de LC-UV descrito apresentou excelentes resultados de exatidão e reprodutibilidade na determinação dos isômeros. Estes são separados com tempos de análise inferiores a 10 min. Ressalta-se neste método a preparação rápida, sem tratamento prévio, das amostras para análise. A preparação das amostras de creme envolve a solubilização do citral, filtração, diluição e nova filtração para injeção no Cromatógrafo à Líquido. Com este tratamento, parte dos componentes da formulação fica insolúvel e é eliminada na primeira filtração. O resultado é um cromatograma “limpo” sem a

presença dos interferentes da matriz do creme e com todo o citral solubilizado, conforme comprovam os resultados de recuperação (exatidão) do método.

O estudo de estabilidade do neral e geranial em soluções aquosas com diferentes pH e armazenados em diferentes temperaturas demonstrou rápida degradação, restando 25% ou menos dos isômeros após 30 dias em qualquer das condições avaliadas (faixa de pH 4,0 – 8,0 e temperaturas 6, 18 e 30 °C). A avaliação do citral em solventes orgânicos e no creme apresentou melhores resultados. Citral solubilizado em etanol 70% apresentou estabilidade quando mantido a 6 °C por pelo menos 60 dias. Este resultado levou a obtenção de formulações, utilizadas no estudo de permeação, tendo etanol 70% como veículo.

O Capítulo IV apresenta os resultados obtidos para os diferentes métodos de quantificação por HPLC-DAD dos antifúngicos (geraniol, neral, geranial, fluconazol, miconazol, terbinafina e butenafina) submetidos ao estudo de permeação. Todos os métodos empregaram a mesma coluna o que permitiu rapidez e agilidade nas análises dos permeados durante o estudo de permeação. A abordagem estatística dos parâmetros analíticos garantiu a confiabilidade dos resultados obtidos pelos métodos e, além disso, permitiu estabelecer critérios de aceitação para os estudos de precisão. O estudo de robustez permitiu caracterizar os efeitos de diferentes fatores (como: composição da fase móvel, pH e presença de trietilamina) no tempo de retenção, resolução, fator de cauda e eficiência da coluna dos picos dos antifúngicos. Os métodos desenvolvidos foram, então, utilizados na etapa analítica do estudo de permeação. Os resultados deste capítulo foram condensados na forma de artigo que será submetido à Revista – *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*.

O Capítulo V apresenta os resultados do estudo de permeação através de membranas de cascos bovinos. A obtenção das membranas mostrou-se um desafio. O auxílio e *expertise* do Prof. Mariath e de seus colaboradores do Laboratório de Anatomia Vegetal – UFRGS foi fundamental para o sucesso na obtenção das membranas de cascos bovinos com espessura média de 200 µm. Este estudo demonstrou que existe uma relação inversa entre o logaritmo da permeabilidade e o peso molecular. Além disso, a acetilcisteína 5% mostrou-se

um excelente promotor de permeação para as membranas de casco bovino, reduzindo também a fase lag. O índice de eficácia foi calculado e demonstrou o potencial do geraniol como antifúngico no tratamento de onicomicoses.

O citral, apesar de possuir a melhor atividade antifúngica entre os monoterpenos testados, é uma molécula pouco estável devido à presença de insaturações e, principalmente, ao grupo aldeído. Diversas estratégias foram avaliadas buscando viabilizar esta substância como fármaco, mas invariavelmente sua degradação prevaleceu.

A estrutura química e propriedades físico-químicas do geraniol são similares ao citral. A troca do grupamento aldeído do citral pela hidroxila alcoólica do geraniol é suficiente para garantir a estabilidade das formulações. Os estudos de atividade antifúngica associado aos ensaios de permeação demonstraram que o geraniol possui potencial para utilização como antifúngico.

O sinergismo verificado para os isômeros do citral demonstra a possibilidade de potencialização dos efeitos dos monoterpenos quando emprega-se misturas destes. O mecanismo de ação, por interação com ergosterol, pode guiar a busca de moléculas que possam potencializar o efeito antifúngico do geraniol.

A permeação através de membranas de cascos bovinos mostrou-se eficiente para os estudos iniciais de formulação para uso tópico em unhas humanas. A acetilcisteína mostrou-se um excelente promotor de permeação e a redução no tempo da fase lag merece maiores estudos, pois este é um fator determinante para o sucesso de formulações para unha.

- AIEMSAARD, J.; AIUMLAMAI, S.; AROMDEE, C.; TAWEECHASUPAPONG, S.; KHUNKITTI, W. The effect of lemongrass oil and its major components on clinical isolate mastitis pathogens and their mechanisms of action on *Staphylococcus aureus* DMST 4745. **Research in Veterinary Science**, v. 91, p. 31–37, 2011.
- ALBINI, A.; FASINI, E. **Drugs Photochemistry and Photostability**. Cambridge: Thomas Graham House, 1998.
- ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Bula do medicamento Sporanox®. Disponível em <http://www4.anvisa.gov.br/BularioEletronico/>. Acessado em: 16 fev. 2013.
- ARAÚJO, A. J. G.; BASTOS, O. M. P.; SOUZA, M. A. J.; OLIVEIRA, J. C. Onicomiose por fungos emergentes: análise clínica, diagnóstico laboratorial e revisão. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 78, n. 4, p. 445-455, 2003.
- BASSOLÉ, I.H.N.; 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, p. 1070– 1074, 2011.
- BERKER, D. A. R.; ANDRE, J.; BARAN, R. Nail biology and nail science. **International Journal of Cosmetic Science**, v. 29, p. 241–275, 2007.
- BOHN, M. KRAEMER, K. T. Dermatopharmacology of ciclopirox nail lacquer topical solution 8% in the treatment of onychomycosis. **Journal of American Academy of Dermatology**, v. 43, n. 4, p. S57-S69, 2000.
- BRAGULLA, H. H.; HOMBERGER, D. G. Structure and functions of keratin proteins in simple, stratified, keratinized and cornified epithelia. **Journal of Anatomy**, n. 214, p. 516–559, 2009.
- BRASIL. Farmacopeia Brasileira - Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Brasília: Anvisa, v. 2, 2010.
- BRODIN, B.; STEFFANSEN, B.; NIELSEN, C. U. Passive diffusion of drug substances: the concepts of flux and permeability. In: Steffansen, B.; Brodin, B.; Nielsen, C. U. **Molecular Biopharmaceutics: Aspects of Drug Characterisation, Drug Delivery and Dosage Form Evaluation**. London: Pharmaceutical Press, 2009.
- BROWN, M. B.; KHENGAR, R. H.; TURNER, R. B.; FORBES, B.; TRAYNOR, M. J.; EVANS, C. R. G.; JONES, S.A. Overcoming the nail barrier: A systematic investigation of unguis chemical penetration enhancement. **International Journal of Pharmaceutics**, n. 370, p. 61–67, 2009.

- CAPUTO, R.; DE BOULLE, K.; DEL ROSSO, J.; NOWICKI, R. Prevalence of superficial fungal infections among sports-active individuals: results from the Achilles survey, a review of the literature. **Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology**, v. 15, p. 312–316, 2001.
- CARRASCO, H.; RAIMONDI, M.; SVETAZ, L.; LIBERTO, M.; RODRIGUEZ, M. V.; ESPINOZA, L.; MADRID, A.; ZACCHINO, S. Antifungal Activity of Eugenol Analogues. Influence of Different Substituents and Studies on Mechanism of Action. **Molecules**, v. 17, p. 1002-1024, 2012.
- CARSTENSEN, J. T.; RHODES, C. T. **Drug Stability: Principles and practices**. Third edition, revised and expanded. Marcel Dekker: Nova York - Basel, 2000.
- CEREDA, M.P. **Ciclodextrinas: características e aplicações**. In: **Cereda, M.P. Culturas de tuberosas amiláceas Latino Americanas**. Fundação Cargill: Campinas, 2001.
- CHALLA, R.; AHUJA, A.; ALI, J.; KHAR, R.K. Cyclodextrins in Drug Delivery: An Updated Review. **AAPS PharmSciTech**, v. 6, n. 2, p. 329-357, 2005.
- CHOI, C.J.; DECKER, E.A.; HENSON, L.; POPPLEWELL, L.M.; MCCLEMENTS, D.J. Stability of Citral in Oil-in-Water Emulsions Prepared with Medium-Chain Triacylglycerols and Triacetin. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v. 57, p. 11349–11353, 2009.
- CHOI, S. J.; DECKER, E. A.; HENSON, L.; POPPLEWELL, L. M.; MCCLEMENTS, D. J. Influence of droplet charge on the chemical stability of citral in oil-in-water emulsions. **Journal of Food Science**, v. 75, n. 6, p. 536-540, 2010.
- CLSI - Clinical and Laboratory Standards Institute. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts. Approved standard CLSI M27-A3, Wayne, PA, 2008a.
- CLSI - Clinical and Laboratory Standards Institute. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of Filamentous Fungi. Approved standard CLSI M38-A2. Wayne, PA, 2008b.
- DJORDJEVIC, D., L. CERCACI, J. ALAMED, D. J. MCCLEMENTS AND E. A. DECKER. "Chemical and physical stability of citral and limonene in sodium dodecyl sulfate-chitosan and gum arabic-stabilized oil-in-water emulsions." **Journal of Agriculture Food Chemistry**, v. 55, n. 9, p. 3585-3591, 2007.
- EDRIS, A.E. Pharmaceutical and Therapeutic Potentials of Essential Oils and Their Individual Volatile Constituents: A Review. **Phytotherapy Research**, v. 21, p. 308–323, 2007.

EINARSON, T. R.; GUPTA, A. K.; SHEAR, N. H.; ARIKIAN, S. Clinical and economic factors in the treatment of onychomycosis. **Pharmacoeconomics**, v. 9, n. 4, p. 307-320, 1996.

ELEWSKI, B. E., CHARIF M. A. Prevalence of onychomycosis in patients attending a dermatology clinic in northeastern Ohio for other conditions. **Archives of Dermatology**, v. 33, p. 1172–1173, 1997.

FERREIRA, M.M.C.; ANTUNES, A.M.; MELGO, M.S. VOLPE, P.L.O. Quimiometria I: calibração multivariada, um tutorial. **Química Nova**, v. 22, n. 5, 1999.

ERMER, J. Validation in pharmaceutical analysis. Part I: an integrated approach. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 24, p. 755-767, 2001.

FROST, D. J., K. D. BRANDT, D. CUGIER AND R. GOLDMAN. A whole-cell *Candida albicans* assay for the detection of inhibitors towards fungal cell wall synthesis and assembly. **Journal of Antibiotics**, v. 48, n. 4, p. 306-310, 1995

GHANNOUM, M. A.; HAJJEH, R. A.; SCHER R.; KONNIKOV, N.; GUPTA, A. K.; SUMMERBELL, R.; SULLIVAN, S.; DANIEL, R.; KRUSINSKI, P.; FLECKMAN, P.; RICH, P.; ODOM, R.; ALY, R.; PARISER, D.; ZAIAC, M.; REBELL, G.; LESHER, J.; GERLACH, B.; PONCE-DE-LEON, G. F.; GHANNOUM, A.; WARNER, J.; ISHAM, N.; ELEWSKI, B. A large-scale North American study of fungal isolates from nails: the frequency of onychomycosis, fungal distribution, and antifungal susceptibility patterns. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 43, p. 641–648, 2000.

GONÇALVES, M.J.; CRUZ, M.T.; CAVALEIROA, C.; LOPESB, M.C.; SALGUEIROA, L. Chemical, antifungal and cytotoxic evaluation of the essential oil of *Thymus zygis* subsp. *Sylvestris*. **Industrial Crops and Products**, v. 32, p. 70–75, 2010.

GRIFFITH, R.; TRACY, T. Antifungal Drugs. In: Williams, D.A.; Lemke, T.L. **Foye's Principles of Medicinal Chemistry**, Baltimore: Lippincott Williams & Wilkins, 2002.

GUPTA, A. K.; EINARSON, T. R.; SUMMERBELL, R. C.; SHEAR, N. H. An overview of topical antifungal therapy in dermatomycoses. A North American perspective. **Drugs**, v. 55, n. 5, p. 645-674, 1998.

HAMMER, K. A.; CARSON, C. F.; RILEY, T. V. In-vitro activity of essential oils, in particular *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil and tea tree oil products, against *Candida* spp. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 42, p. 591 – 595, 1998.

- HEMMATEENEJAD, B.; AKHOND, M.; SAMARI, F. A comparative study between PCR and PLS in simultaneous spectrophotometric determination of diphenylamine, aniline, and phenol: Effect of wavelength selection. **Spectrochimica Acta Part A**, v. 67, p. 958–965, 2007.
- IACONINOTO, A.; CHICCA, M.; PINAMONTI, S.; CASOLARI, A.; BIANCHI, A.; SCALIA, S. Influence of cyclodextrin complexation on the photodegradation and antioxidant activity of α -tocopherol. **Pharmazie**, v. 59, p. 30-33, 2004.
- IWATA, M.; FUKAMI, T.; KAWASHIMA, D.; SAKAI, M.; FURUISHI, T.; SUZUKI, T.; TOMONO, K.; UEDA, H. Effectiveness of mechanochemical treatment with cyclodextrins on increasing solubility of glimepiride. **Pharmazie**, v. 64, p. 390-394, 2009.
- INOUE, S.; UCHIDA, K.; YAMAGUCHI, H. *In-vitro* and *in-vivo* anti-Trichophyton activity of essential oils by vapour contact. **Mycoses**, v. 44, p. 99-107, 2001.
- KHAN, M. S. AND I. AHMAD. In vitro antifungal, anti-elastase and anti-keratinase activity of essential oils of Cinnamomum-, Syzygium- and Cymbopogon-species against *Aspergillus fumigatus* and *Trichophyton rubrum*. **Phytomedicine**, v. 19, n. 1, p. 48-55, 2011.
- KHAN, M. S., A. MALIK AND I. AHMAD. "Anti-candidal activity of essential oils alone and in combination with amphotericin B or fluconazole against multi-drug resistant isolates of *Candida albicans*." **Medical Mycology**, v. 50, n. 1; p. 33-42, 2012.
- KHENGAR, R. H.; JONES, S. A.; TURNER, R. B.; FORBES, B.; BROWN, M. B. Nail Swelling as a Pre-formulation Screen for the Selection and Optimisation of Ungual Penetration Enhancers. **Pharmaceutical Research**, v. 24, n. 12, p. 2207-2212, 2007.
- KIMURA, K.; NISHIMURA, H.; IWATA, I.; MIZUTANI, J. Deterioration mechanism of lemon flavor. 2. Formation mechanism of off-odor substances arising from citral. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 31, p. 801 – 804, 1983.
- KITAHARA, T.; OGAWA, H. The extraction and characterization of human nail keratin. **Journal of Dermatological Science**, v. 2, p. 402-406, 1991.
- KOBAYASHI, Y.; MIYAMOTO, M.; SUGIBAYASHI, K.; MORIMOTO, Y. Enhancing Effect of N-acetyl-L-cysteine or 2-Mercaptoethanol on the in vitro Permeation of 5-Fluorouracil or Tolnaftate through the Human Nail. **Chemical Pharmaceutical Bulletin**, v. 46, n. 11, p. 1797-1802, 1998.

- LIMA, I. O.; NÓBREGA, F. M.; OLIVEIRA, W. A.; LIMA, E. O.; MENEZES, E. A.; CUNHA, F. A.; DINIZ, F. M. Anti-Candida albicans effectiveness of citral and investigation of mode of action. **Pharmaceutical Biology**, v. 50, n. 12, p.1536-41, 2012.
- LINDE, J.H.; COMBRINCK, S. ; REGNIER, T.J.C.; VIRIJEVIC, S. Chemical composition and antifungal activity of the essential oils of *Lippia rehmannii* from South Africa. **South African Journal of Botany**, v. 76, p. 37–42, 2010.
- LUSIANA; REICHL, S.; MÜLLER-GOYMANN, CC. Keratin film made of human hair as a nail plate model for studying drug permeation. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, n. 78, v. 3, p. 432-40, 2011.
- MAKI-ARVELA, P.; KUMARA, N.; KUBICKA, D.; NASIR, A.; HEIKKIL, T.; LEHTO, V.P.; SJOHOLM, R.; SALMI, T.; MURZIN, D.Y. One-pot citral transformation to menthol over bifunctional micro- and mesoporous metal modified catalysts: Effect of catalyst support and metal. **Journal of Molecular Catalysis A: Chemical**, v. 240, p. 72–81, 2005.
- MALHOTRA, G. G.; ZATZ, J. L. Investigation of Nail Permeation Enhancement by Chemical Modification Using Water as a Probe. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 91, n. 2, 2002.
- MARTY, J. L. Amorolfine nail laquer: a novel formulation. **Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology**, v. 4, n. 1, p. S17-S21, 1995.
- MASUDA, T.; ODAKA, Y.; OGAWA, N.; NAKAMOTO, K.; KUNINAGA, H. Identification of Geranic Acid, a Tyrosinase Inhibitor in Lemongrass (*Cymbopogon citratus*). **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v. 56, p. 597–601, 2008.
- MECHANISMS IN MEDICINE. The Role of Amphotericin. Mechanisms in Medicine Interactive Animated Medical Education, 2012. Disponível em: <http://www.youtube.com/>. Acessado em: 12 de abril de 2013.
- MEI, L.; CHOI, S.J.; ALAMED, J.; HENSON, L.; POPPLEWELL, M.; MCCLEMENTS, D.J.; DECKER, E.A. Citral Stability in Oil-in-Water Emulsions with Solid or Liquid Octadecane. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v. 58, p. 533–536, 2010.
- MERTIN, D.; LIPPOLD, B. C. In-vitro permeability of the human nail and of a keratin membrane from bovine hooves: penetration of chloramphenicol from lipophilic vehicles and a nail lacquer. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, n. 49, v. 3, p. 241-245, 1997a.
- MERTIN, D.; LIPPOLD, B. C. In-vitro permeability of the human nail and of a keratin membrane from bovine hooves: Influence of the partition coefficient

octanol/water and the water solubility of drugs on their permeability and maximum flux. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, n. 49, v. 1, p. 30-34, 1997b.

MERTIN, D.; LIPPOLD, B. C. In-vitro Permeability of the Human Nail and of a Keratin Membrane from Bovine Hooves: Prediction of the Penetration Rate of Antimycotics through the Nail Plate and their Efficacy. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, n. 49, v. 9, p. 866-72, 1997c.

MESA-ARANGO, A. C.; SCORZONI, L.; ZARAGOZA, O. It only takes one to do many jobs: Amphotericin B as antifungal and immunomodulatory drug. **Frontiers in Microbiology**, v. 3, p. 1-10, 2012.

MINGOTI, S.A. **Análise se dados através de métodos de estatística multivariada: uma abordagem aplicada**. Belo Horizonte: Editora UFMG, 2005.

MONTI, D.; SACCOMANI, L.; CHETONI, P.; BURGALASSI, S.; TAMPUCCI, S.; MAILLAND, F. Validation of bovine hoof slices as a model for infected human toenails: in vitro ciclopirox transungual permeation. **British Journal of Dermatology**, n. 165, p. 99–105, 2011.

MURDAN, S. Drug delivery to the nail following topical application. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 236, n. 1-2, p. 1-26, 2002.

MYOUNG, Y.; CHOI, H. Permeation of ciclopirox across porcine hoof membrane: effect of pressure sensitive adhesives and vehicles. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 20, p. 319–325, 2003.

NGAN, L. T., J. K. MOON, J. H. KIM, T. SHIBAMOTO AND Y. J. AHN . Growth-inhibiting effects of Paeonia lactiflora root steam distillate constituents and structurally related compounds on human intestinal bacteria. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 28, n. 4, p. 1575-1583, 2012

NAKAMURA, A.; ARIMOTO, M.; TAKEUCHI, K.; FUJII, T. A Rapid Extraction Procedure of Human Hair Proteins and Identification of Phosphorylated Species. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, v. 25, n. 5, p. 569—572, 2002.

NEUMANN, A.BAGINSKI, M. CZUB, J. How Do Sterols Determine the Antifungal Activity of Amphotericin B? Free Energy of Binding between the Drug and Its Membrane Targets. **Journal of American Chemical Society**, v. 132, p. 18266–18272, 2010.

NIST – National Institute of Standard and Technology. Disponível em: <http://webbook.nist.gov/chemistry/name-ser.html> , 2011.

- NOGUEIRAS-NIETO, L.; GÓMEZ-AMOZA, J. L.; DELGADO-CHARRO, M. B.; OTERO-ESPINAR, F.J. Hydration and N-acetyl-L-cysteine alter the microstructure of human nail and bovine hoof: Implications for drug delivery. **Journal of Controlled Release**, v. 156, p. 337–344, 2011.
- NOGUEIRAS-NIETO, L.; GÓMEZ-AMOZA, J. L.; DELGADO-CHARRO, M. B.; OTERO-ESPINAR, F.J. Thermogelling hydrogels of cyclodextrin/poloxamer polypseudotaxanes as aqueous-based nail lacquers: Application to the delivery of triamcinolone acetonide and ciclopirox olamine. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, n. 83, v. 3, p. 370-377, 2013.
- OECD SIDS – Organisation for Economic Co-operation and Development (Screening Information Dataset). **Citral**. Disponível em: www.oecd.org, 2011.
- OMAR, J.; ALONSO, I.; OLIVARES, M.; VALLEJO, A.; ETXEBARRI, N. Optimization of comprehensive two-dimensional gas-chromatography (GC xGC) mass spectrometry for the determination of essential oils. **Talanta**, v. 88, p. 145-151, 2012.
- PARK, M.J.; GWAK, K.S.; YANG, I.; KIM, K.W.; JEUNG, E.B.; CHANG, J.W.; CHOI, I.G. Effect of citral, eugenol, nerolidol and α -terpineol on the ultrastructural changes of *Trichophyton mentagrophytes*. **Fitoterapia**, v. 80, p. 290–296, 2009.
- PICKETT, J.A.; WILLIAMS, I.H.; MARTIN, A.P.; SMITH, M.C. NASONOV PHEROMONE OF THE HONEY BEE, *Apis mellifera* L. (HYMENOPTERA: APIDAE) Part I. Chemical Characterization. **Journal of Chemical Ecology**, v. 6, n. 2, p. 425-434, 1980.
- PIERARD, G. Onychomycosis and other superficial fungal infections of the foot in the elderly: a Pan-European Survey. **Dermatology**, n. 202, p. 220-224, 2001.
- PIHLASALO, J.; KLIKA, K.D.; MURZIN, D.Y.; NIEMINEN, V. Conformational equilibria of citral. **Journal of Molecular Structure-THEOCHEM**, v. 814, p. 33-41, 2007.
- PRASAD, C.S.; SHUKLA, R.; KUMAR, A.; DUBEY, N.K. In vitro and in vivo antifungal activity of essential oils of *Cymbopogon martini* and *Chenopodium ambrosioides* and their synergism against dermatophytes. **Mycoses**, v. 53, p. 123–129, 2009.
- RAUBER, C.S.; GUTERRES, S.S.; SCHAPOVAL, E.E.S. LC determination of citral in *Cymbopogon citratus* volatile oil. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 37, p. 597–601, 2005.
- Rawat, S.; Jain, S.K. Rofecoxib- β -cyclodextrin inclusion complex for solubility enhancement. *Pharmazie*, v. 58, p. 639 – 641, 2003.

- REICHL, S. Films based on human hair keratin as substrates for cell culture and tissue engineering. *Biomaterials*, v. 30, p. 6854–6866, 2009.
- REPKA, M. A.; MIDIDODDIA, P. K.; STODGHILLA, S. P. Influence of human nail etching for the assessment of topical onychomycosis therapies. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 282, p. 95–106, 2004.
- RIBEIRO, L.H.S.; NOVAES, E.M.C.; NEVES, R.G. A unha: estudo da anatomia, fisiologia e alterações da cor. *Revista Brasileira de Dermatologia*, n. 70, v. 6, p. 567-577, 1995.
- RODGERS, P. BASSLER, M. Treating Onychomycosis. *American Family Physician*, v. 63, n. 4, p. 663 – 672, 2001.
- RXLIST. The Internet Drug Index. Disponível em: www.rxlist.com. Acessado em: 16 nov. 2013.
- SACCHETTI, G.; MAIETTI, S.; MUZZOLI, M.; SCAGLIANTI, M.; MANFREDINI, S.; RADICE, M.; BRUNI, R. Comparative evaluation of 11 essential oils of different origin as functional antioxidants, antiradicals and antimicrobials in foods. *Food Chemistry*, v. 91, p. 621–632, 2005.
- SADDIQ, A.A.; KHAYYAT A.S. Chemical and antimicrobial studies of monoterpene: Citral. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, v. 98, p. 89–93, 2010.
- SALTIEL, J.; SUN, Y.P. Cis-Trans Isomerization of C=C Double Bonds. *Photochromism*, p. 64-164, 2003.
- SAMPAYO, C. Fármacos Antifúngicos. Faculdade de Farmácia – Universidade de Lisboa, 2011. Disponível em: http://xa.yimg.com/kq/groups/23319928/1355357798/name/Anti_Fungos_Parasitas_f.pdf. Acessado em: 10 de abril de 2013.
- SCHUCK, V.J.A.; FRATINI, M.; RAUBER, C.S.; HENRIQUES, A.; SCHAPOVAL, E.E.S. Avaliação da atividade antimicrobiana de *Cymbopogon citratus*. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 37, n. 1, p. 45-49, 2001
- SERAFIN, C.; NART, V.; MALHEIROS, A.; CRUZ, A. B.; MONACHE, F. D.; GETTE, M. A.; ZACCHINO, S.; FILHO, V. C. Avaliação do potencial antimicrobiano de *Plinia glomerata* (Myrtaceae). *Revista Brasileira de Farmacognosy*, v. 17, n. 4, p. 578 – 582, 2007.
- SHIVAKUMAR, H. N.; VAKA, S. R. K.; MADHAV, S. N. V.; CHANDRA, H.; MURTHY, S. N. Bilayered Nail Lacquer of Terbinafine Hydrochloride for Treatment of Onychomycosis. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 99, n. 10, p. 4267-4276, 2010.

- SHOJI, A.; YANAGIDA, A.; SHINDO, H.; ITO, Y.; SHIBUSAWA, Y. Counter-current chromatographic estimation of hydrophobicity of Z-(cis) and E-(trans) enalapril and kinetics of cis/trans isomerization. **Journal of Chromatography A**, v. 1157, p. 101–107, 2007.
- SHUKLA, R.; KUMAR, A.; SINGH, P.; DUBEY, N.K. Efficacy of Lippia alba (Mill.) N.E. Brown essential oil and its monoterpene aldehyde constituents against fungi isolated from some edible legume seeds and aflatoxin B1 production. **International Journal of Food Microbiology**, v. 135, p. 165–170, 2009.
- SIKKEMA, J.; BONT, J. A. M.; POOLMAN, B. Mechanisms of Membrane Toxicity of Hydrocarbons. **Microbiological Reviews**, v. 59, p. 201–222, 1995.
- SILVA, C.L.; PEREIRA, J.C.; RAMALHO, A.; PAIS, A.A.C.C.; SOUSA, J.J.S. Films based on chitosan polyelectrolyte complexes for skin drug delivery: Development and characterization. **Journal of Membrane Science**, v. 320, p. 268–279, 2008.
- SILVA, C.B. **Novas formas farmacêuticas contendo óleo volátil de Cymbopogon citratus: estudos de formulação, estabilidade e atividade biológica**. 2005. Tese (Doutorado) – Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2005.
- SIMÕES, C.M.O.; SPITZER, V. Óleos Voláteis. IN: SIMÕES, C.M.O.. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. Florianópolis: UFSC, 5 ed., 2004.
- SNYDER, L.R.; KIRKLAND, J.J.; DOLAN, J.W. **Introduction to modern liquid chromatography**. New Jersey : John Wiley, 3 ed., 2010.
- SOMOLINOS, M.; GARCIA, D.; CONDO, S.; MACKAY, B.; PAGA, R. Inactivation of Escherichia coli by citral. **Journal of Applied Microbiology**, v. 108, p. 1928–1939, 2009.
- SOUZA, E. A. F.; ALMEIDA, L. M. M.; GUILHERMETTI, E.; MOTA, V. A.; ROSSI, R. M.; SVIDZINSKI, T. I. E. Frequência de onicomioses por leveduras em Maringá, Paraná, Brasil. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 82, n. 2, p. 151-156, 2007.
- SYKES, P. **Guia de Mecanismos da Química Orgânica**. São Paulo: Editora da Universidade de São Paulo, 2 ed., 1969.
- RUKTANONCHAI, R.; SRINUANCHAI, U. W.; SAESOO, S.; SRAMALA, I.; PUTTIPIPATKHACHORN, S.; SOOTTITANTAWAT, A.. "Encapsulation of citral

isomers in extracted lemongrass oil with cyclodextrins: molecular modeling and physicochemical characterizations." **Bioscience Biotechnololy Biochemistry**, v. 75, n.12, p. 2340-2345, 2011.

THE MERCK Index. New Jersey: Whitehouse, 14 ed., 2008.

THOMAS, J.; JACOBSON, G. A.; NARKOWICZ, C. K.; PETERSON, G. M.; BURNET, H.; SHARPE, C. Toenail onychomycosis: an important global disease burden. **J Clin Pharm Ther**, n. 35, v. 5, p. 497-519, 2010.

TRASARTI, A.F.; MARCHI, A.J.; APESTEGUÍA, C.R. Highly selective synthesis of menthols from citral in a one-step process. **Journal of Catalysis**, v. 224, p. 484–488, 2004.

TRAYNOR, M. J.; TURNER, R. B.; EVANS, C. R. G.; KHENGAR, R. H.; JONES, S. A.; BROWN, M. B. Effect of a novel penetration enhancer on the unguinal permeation of two antifungal agents. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, n. 62, p. 730–737, 2010.

TUREK, C.; STINTZING, F.C. Application of high-performance liquid chromatography diode array detection and mass spectrometry to the analysis of characteristic compounds in various essential oils. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 400, p. 3109-3123, 2011.

UENO, T.; MASUDA, H.; HO, C. T. Formation mechanism of p-methylacetophenone from citral via tert-alkoxy radical intermediate. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 52, p. 5677 – 5684, 2004.

VILLA, C.; GAMBARO, R.; MARIANI, E.; DORATO, S. High-performance liquid chromatographic method for the simultaneous determination of 24 fragrance allergens to study scented products. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 44, p. 755–762, 2007.

YANG, X., TIAN, H.; HO, C. T.; HUANG, Q. Inhibition of citral degradation by oil-in-water nanoemulsions combined with antioxidants. **Journal of Agriculture Food Chemistry**, v. 59, n. 11, p. 6113-6119, 2011

YANG, X.; TIAN, H.; HO, C. T.; HUANG, Q. Stability of citral in emulsions coated with cationic biopolymer layers. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v. 60, n. 1, p. 402-409, 2012.

WALTERS, K. A.; FLYNN, G. L.; MARVEL, J. R.. Physicochemical characterization of the human nail: Permeation pattern for water and the homologous alcohols and differences with respect to the stratum corneum. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, n. 35, p. 28-33, 1983.

WALTERS, K. A.; FLYNN, G. L.; MARVEL, J. R. Physicochemical characterization of the human nail: Solvent effects on the permeation of

homologous alcohols. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, n. 37, p.771-775, 1985.

WALTERS, K. A.; ABDALGHAFORB, H. M.; LANE, M. E. The human nail – Barrier characterisation and permeation enhancement. **International Journal of Pharmaceutics**, n. 435, p. 10– 21, 2012.

WANG, Z.; SHMEIS, R.A. Dissolution Controlled Drug Delivery Systems. In: LI, X.; JASTI, B. **Design of Controlled Release Drug Delivery Systems**. New York: McGraw-Hill, 2006.

WEISHEIMER, V.; MIRON, D.; SILVA, C.B.; GUTERRES, S.S.; SCHAPOVAL, E.E.S. Microparticles containing lemongrass volatile oil: preparation, characterization and thermal stability. **Pharmazie**, v. 65, p. 885–890, 2010.

WEISHEIMER, V. **Micropartículas contendo óleo de cymbopogon citratus: desenvolvimento, validação de método analítico e preliminar de estabilidade**. Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2008.

ZORE, G.B.; THAKRE, A.D.; JADHAV, S.; KARUPPAYIL, S.M. Terpenoids inhibit *Candida albicans* growth by affecting membrane integrity and arrest of cell cycle. **Phytomedicine**, v. 18, p. 1181– 1190, 2011.

Publicação na Revista *Current Pharmaceutical Analysis*.

Current Pharmaceutical Analysis, 2012, 8, 401-408

401

Spectrophotometric Simultaneous Determination of Citral Isomers in Cyclodextrin Complexes with Partial Least Squares Supported Approach

Diogo Miron^{a*}, Fernanda Battisti^a, Carla Schwengber Ten Caten^b, Paulo Mayorga^a and Elfrides Eva Scherman Schapoval^a

^aPrograma de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Faculdade de Farmácia, UFRGS, Porto Alegre-RS, Brasil

^bPrograma de Pós-Graduação em Engenharia da Produção, Escola de Engenharia, UFRGS, Porto Alegre-RS, Brasil

Abstract: This article describes the development and optimization of a UV spectrophotometric method to evaluate the isomers of citral in cyclodextrins complexes by a partial least squares (PLS) regression model. The central composite design (CCD) associated with the response surface methodology (RSM) was applied to select the wavelength range that provides the best prediction results. β -cyclodextrin (β -CD) and hydroxypropyl- β -cyclodextrin (HP- β -CD) complexes with citral were prepared in ethanolic solution and spray dried. These samples were analyzed by an optimized PLS-UV model and the results compared with HPLC-UV determinations to evaluate the predictive power of the PLS-UV model. The results from the PLS-UV model showed a relative standard deviation of prediction (RSEP) ranging from 0.87% for neral up to 1.42% for geranial. The relative standard deviation (RSD) obtained in analyses of four replicates of citral-cyclodextrins complexes ranged from 2.2% to 4.1%. Geranial showed higher affinity than neral for both types of cyclodextrins evaluated. Finally, β -CD was shown to be a better complexing agent for citral than HP- β -CD.

Keywords: Citral, Cyclodextrins, Encapsulating Agents, Factorial Design, Geranial, HPLC, Isomers, Microencapsulation, Neral, PLS, UV, Volatile Oils.

Certificado de Apresentação de Trabalho em Congresso de Micologia



Certificamos que Tatiane Caroline Daboit participou do VI CONGRESSO BRASILEIRO DE MICOLOGIA, realizado no período de 29/11/2010 a 02/12/2010, em Brasília - DF - Brasil, na qualidade de APRESENTADOR ORAL, para o trabalho:

Atividade antifúngica do citral em diferentes apresentações frente a fungos filamentosos. Daboit TC, Miron D, Antocheyis L, Battisti F, Mayorga P, Schapoval E, Scrofermeker ML. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS. tatidaboit@gmail.com. [Antifungal activity of citral in different presentations against filamentous fungi]

Brasília, 02 de dezembro de 2010

José Carmine Dianese

José Carmine Dianese

Presidente do VI Congresso Brasileiro de Micologia
Sociedade Brasileira de Micologia

Certificado de participação/apresentação de pôster e resumo do trabalho.



This is to certify that

Diogo Miron
from Brazil

presented a poster:

Delapril and Manidipine Measurements by Liquid Chromatography-Tandem
Mass Spectrometry in Pharmaceutical Formulation
Vitor Todeschini; Diogo Miron; Maximiliano S. Sangoi; Nadia Maria Volpato

Fesoterodine Stress Degradation Behavior by LC-UV and LC-ESI-MS
Maximiliano S. Sangoi, Diogo Miron, Vitor Todeschini, Martin Steppe

Robustness Test for Identification of Relevant Factors in HPLC Analysis for
Determination of Antifungal Isomers and Establishment of System
Suitability Limits
Diogo Miron, Fernanda Batisti, Paulo Mayorga, Elfrides Eva Scherman Schapoval

RP-LC Method and Mass Spectrometry Detection for a Main Degradation
Product of
Vildagliptin in Tablets
Amanda Thomas Barden, Bárbara Salamon, Diogo Miron, Elfrides Eva Scherman Schapoval, Martin Steppe

36th HPLC Symposium
19 – 23 June, 2011
Budapest, Hungary


Prof. Attila Felinger
Symposium Chairman

Conference Secretariat: Diamond Congress Ltd.
H-1255 Budapest, POB 48
Tel: +36 1 214 7701, Fax: +36 1 201 2680
<http://hplc2011.com/>