

Brazilian Journal of

HEALTH AND PHARMACY

Conselho Regional de Farmácia de Minas Gerais

Volume 2, Número 1, 2020.



EDITORA CHEFE

Andrea Grabe Guimarães

Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto, MG

COMITÊ EDITORIAL

Andrea Grabe Guimarães

Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto, MG

Eduardo Damasceno Costa

Faculdade Ciências da Vida, Sete Lagoas, MG

Jorgino Julio Cesar

Centro Universitário UMA, Belo Horizonte, MG

Waldemar de Paula Júnior

Universidade Estadual de Montes Claros, Montes Claros, MG

REVISORES

Alessandra Ésther de Mendonça

Universidade Federal de Juiz de Fora

Alessandra Teixeira Vidal Diniz

Instituto Federal de Minas Gerais, Campus Congonhas, MG

Ana Carolina Moreira Souza

Faculdade da Região dos Lagos – FERLAGOS, Macaé, RJ

Ana Paula Venuto Moura

Universidade Estadual de Montes Claros, Montes Claros, MG

Bárbara Nobre Lafetá

Universidade Estadual de Montes Claros, Montes Claros, MG

Caio César Sestile

Sociedade Educacional de Santa Catarina – UniSociesc, Jaraguá do Sul, SC

Carla Penido Serra

Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto, MG

Cristina Padre Cardoso

Universidade Federal da Bahia, Vitória da Conquista, BA

Dorothea Schmidt França

Universidade Estadual de Montes Claros, Montes Claros, MG

Elaine Amaral Leite

Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG

Elza Conceição de Oliveira Sebastião

Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto, MG

Eric Diego Turossi Amorim

Centro Sul Brasileiro de Pós Graduação (CENSUPEG)

Fabiana da Silva Vieira Matrangolo

Universidade Estadual de Montes Claros, Montes Claros, MG

Fabrcio Rios Santos

Universidade Federal do Mato Grosso, Cuiabá, MT

Flávia Dayrell França

Universidade Federal do Espírito Santo, São Mateus, ES

Geraldo Célio Brandão

Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto, MG

Juliana Hipólito Pessotti

Faculdade Dinâmica, Ponte Nova, MG

Lidiane Meire Kohler

Faculdade do Futuro – Manhauçu, MG

Liliam Teixeira Oliveira

Centre for Drug Research and Development – CDRD, Canadá

Luís Paulo Souza e Souza

Universidade Federal de São João Del-Rei, Divinópolis, MG

Luiz Fernando Medeiros Teixeira

Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto, MG

Maria Arlete Silva Pires

Centro Universitário UNA, Belo Horizonte, MG

Maria das Graças Braga Ceccato

Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG

Maria Elvira Poleti Martucci

Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto, MG

Mariana Martins Gonzaga do Nascimento

Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG

Mariléia Chaves Andrade

Universidade Estadual de Montes Claros, Montes Claros, MG

Nádia Aléssio Velloso

Universidade Federal de Mato Grosso, Sinop, MT

Neila Márcia Silva Barcellos

Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto, MG

Pollyanna Álvaro Spósito

Faculdade Dinâmica, Ponte Nova, MG

Renata Nascimento Macedo

Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto, MG

Rondinelle Gomes Pereira

Faculdade Pitágoras, Governador Valadares, MG

Sylvain Richard

Université de Montpellier - França

Valéria Barbosa Souza

Universidade Estadual de Campinas, Campinas, SP

Vanessa Carla Furtado Mosqueira

Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto, MG

EQUIPE EDITORIAL

Veronica Cristina Gomes Soares

Universidade Paulista, Jundiaí, SP

Veruska Cavalcanti Barros

Universidade Federal do Piauí, Teresina, PI

Vinícius Viana Pereira

Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG

Wemerson de Castro Oliveira

EBTT do Instituto Federal Sul-rio-grandense (IFSul), Lajeado, RS

Yara Alvarenga Drumond

Secretaria Municipal de Saúde, Betim, MG

CONSELHO REGIONAL DE FARMÁCIA DE MINAS GERAIS

DIRETORIA CRF/MG – GESTÃO 2020/2021

Júnia Célia De Medeiros

Presidente

Márcia Cristina De Oliveira Alfenas

Vice-presidente

Leandro Catarina Leal

Secretário-geral

Christian Francisco De Matos

Diretor Tesoureiro

SECRETARIA ADMINISTRATIVA

Maria Cláudia Moreira de Faria

Waltovânio Cordeiro de Vasconcelos

COMUNICAÇÃO E DESIGN

Amanda Coimbra

Héllen Torres

Pedro Godoy

Margarida Oliveira

Rafaela de Angeli Gama

5**O descarte de insumos farmacêuticos em estabelecimentos de saúde**

Disposal of pharmaceutical supplies in health establishments

OLIVEIRA, L.G.T.; SOUZA, C. S.; DUARTE, A.C.; BARBOSA, A. P.<https://doi.org/10.29327/226760.2.1-1>**13****Percepção dos profissionais de uma unidade de Estratégia da Saúde da Família frente a pacientes que apresentam fatores de risco de suicídio**

Perceptions of professionals of a Family Health Strategy unit regarding patients with risk factors for suicide

NEVES, F.V.; RIBEIRO, M.S.P.; SILVA, P.C.; DE PAULA JR., W.; DAMASCENO, E.M.A.<https://doi.org/10.29327/226760.2.1-2>**20****Development of nanostructured lipid carriers containing finasteride**

Desenvolvimento de carreadores lipídicos nanoestruturados contendo finasterida

PALMIERI, M.G.S.; FERREIRA, K.C.B.; VALLE, A.B.C.S.; ALEIXO, D.T.; TAVARES, G.D.; CORRÊA, J.O.A.; PITTELLA, F.<https://doi.org/10.29327/226760.2.1-3>**28****Avaliação da qualidade físico-química e microbiológica de cápsulas de ômega-3 comercializadas no município de Nova Serrana - MG**

Evaluation of quality physical chemistry and microbiological of Omega-3 capsules sold on the city of Nova Serrana - MG

SILVA, R. A.; SOUZA JUNIOR, E. A.; LOPES, L. H. C.; PEDROSA, D. O.; SILVA, K. O.; CORTEZ, E. N.; BRAZ, S. R.; AMARO, S. H.; BRAZ, W. R.<https://doi.org/10.29327/226760.2.1-4>**49****Influência das condições de cultivo sobre a produção de óleo essencial do capim citronela (*Cymbopogon nardus*)**Influence of cultivation conditions on the production of essential oil of citronella grass (*Cymbopogon nardus*)**BRAGA, K.A.S.; CASTRO, H.G.; TEIXEIRA, V.L.S.; BARBOSA, L.C.A.; DEMUNER, A.J.**<https://doi.org/10.29327/226760.2.1-5>**60****Avaliação físico-química e biológica de nanoemulsão contendo clotrimazol como alternativa terapêutica para o tratamento de candidíase vulvovaginal**

Physicochemical and biological evaluation of clotrimazole loaded nanoemulsion as a therapeutic alternative for treatment of vulvovaginal candidiasis

SANTOS, M.M.; FERREIRA, K.C.B.; SANTOS-VALLE, A.B.C.; DINIZ, I.O.M.; FABRI, R.L.; PITTELLA, F.; TAVARES, G.D.<https://doi.org/10.29327/226760.2.1-6>

O descarte de insumos farmacêuticos em estabelecimentos de saúde

Disposal of pharmaceutical supplies in health establishments

OLIVEIRA, L.G.T.¹; SOUZA, C. S.²; DUARTE, A.C.²; BARBOSA, A. P.^{1*}

¹ UNA, Belo Horizonte, MG, Brasil;

² UNIABEU, Belford Roxo, RJ, Brasil.

***Autor Correspondente:** Antony de Paula Barbosa
UNA, Campus Guajajaras Belo Horizonte /MG – CEP: 30140-071
E-mail: antonybarbosa@hotmail.com

DOI: <https://doi.org/10.29327/226760.2.1-1>

RESUMO

O descarte de medicamentos por estabelecimentos de saúde, como farmácias e drogarias, em sua maioria, não se encontra embasado em um plano de gerenciamento de resíduos de serviços de saúde. Com isso, o descarte incorreto de resíduos de serviços de saúde por esses estabelecimentos torna-se uma realidade factível e cada vez mais comum de se observar. O presente estudo construído através da realização de uma revisão da literatura denota de um caráter teórico, explicativo e exploratório com abordagem qualitativa a respeito do tema proposto, além de apresentar soluções para os problemas apontados. O artigo aborda, como eixo central, a problemática do descarte incorreto de resíduos em estabelecimentos de saúde, além disso, explica as consequências que o descarte inadequado desses resíduos pode trazer a saúde humana e do meio ambiente, destaca o uso racional de medicamentos e a importância do farmacêutico clínico na estimulação dessa conduta, descreve políticas inovadoras adotadas em países Americanos e Europeus, discute a partir da classificação de cada resíduo de serviço de saúde como deve ser realizada sua destinação adequada, findado seu prazo de utilização, e menciona políticas adotadas por alguns estados brasileiros que apontam para um desenvolvimento sustentável e mitigador de impactos que estes resíduos podem trazer a saúde humana e do meio ambiente. O descarte incorreto de resíduos de estabelecimentos de saúde pode provocar alterações digestivas na saúde humana, como quadros de alteração gastrointestinal, insuficiência hepática e renal, episódios que afetam o sistema nervoso central como: agitação, ansiedade, depressão respiratória, coma. Muitos desses resíduos ao serem descartados de forma incorreta favorecem à resistência bacteriana, mutagênese e carcinogênese. Políticas como logística reversa e campanhas de destinação adequada de resíduos de medicamentos são algumas ações que têm obtido êxito na destinação correta dos resíduos de serviços de saúde no Brasil. O farmacêutico clínico por possuir uma gama de conhecimentos acerca de medicamentos e efeitos adversos tem se tornado um profissional cada vez requisitado nos estabelecimentos de saúde não apenas para garantir um gerenciamento adequado de resíduos de serviços de saúde, como também para estimular o uso racional de medicamentos por parte da população.

Palavras-chave: Descarte incorreto de resíduos de serviços de saúde; Resíduo de medicamentos; Uso Irracional de medicamentos.

ABSTRACT

The disposal of medicines by health establishments, such as pharmacies and drugstores, for the most part, is not based on a health service waste management plan. Thus, the incorrect disposal of waste from health services by these establishments



becomes a feasible reality and increasingly common to observe. The present study was constructed through a literature review shows a theoretical, explanatory and exploratory character with a qualitative approach regarding the proposed theme, in addition to presenting solutions to the problems pointed out. The article addresses, as a central axis, the problem of incorrect waste disposal in health establishments, in addition, it explains the consequences that improper disposal of this waste can bring to human and environmental health, highlights the rational use of medicines and the importance of the clinical pharmacist in stimulating this conduct, describes innovative policies adopted in American and European countries, discusses from the classification of each health service waste how it should be properly disposed of, after its term of use, and mentions policies adopted by some Brazilian states that aim for sustainable development and mitigate the impacts that these residues can bring to human health and the environment. The incorrect disposal of waste from health establishments can cause digestive changes in human health, such as gastrointestinal disorders, liver and kidney failure, episodes that affect the central nervous system such as: agitation, anxiety, respiratory depression, coma. Many of these residues, when disposed of incorrectly, favor bacterial resistance, mutagenesis and carcinogenesis. Policies such as reverse logistics and campaigns for the proper disposal of drug residues are some actions that have been successful in the correct disposal of healthcare waste in Brazil. The clinical pharmacist for having a range of knowledge about medicines and adverse effects has become a professional increasingly required in health establishments not only to ensure adequate management of waste from health services, but also to encourage the rational use of medicines by the population.

Keywords: Incorrect disposal of waste from health services; Residue of medicines; Irrational use of medicines.

INTRODUÇÃO

Estudos apontam que a população brasileira vem apresentando um número cada vez maior de idosos em comparação a jovens e adultos. Sabe-se que os idosos comumente constituem um porcentual maior da população que apresentam mais de uma comorbidade e, conseqüentemente, a taxa de uso de medicamentos por essa faixa etária é maior. A polifarmácia é uma prática terapêutica muito empregada na geriatria, isto porque com o aumento do catabolismo os idosos tendem a desenvolver um número maior de patologias, e assim necessitam consumir medicamentos com maior frequência quando comparados a jovens e adultos. Além da pirâmide etária invertida, o acesso a medicamentos em estabelecimentos de saúde tem se tornado cada vez mais fácil e a indústria farmacêutica não para de lançar novos fármacos, o que eleva o mercado farmacêutico a um patamar de constante expansão. Com isso, tem se tornado muito comum a utilização de medicamentos de maneira irracional, que após utilizados ou vencidos muitas vezes são descartados de forma incorreta, acarretando prejuízos à saúde

humana como também ao meio ambiente (ALENCAR, 2014, PINTO, 2014).

Práticas como: a distribuição de maneira aleatória de amostras-grátis, a mudança ou interrupção do tratamento, a dispensação de medicamentos além da quantidade ideal para o tratamento do paciente, e o gerenciamento ineficaz do estoque de medicamentos por estabelecimentos de saúde, auxilia no fomento da geração de resíduos que muitas vezes não tem uma destinação adequada (CHAVES, 2014).

Os resíduos resultantes das atividades exercidas por estabelecimentos prestadores de serviços de saúde são considerados Resíduos de Serviços de Saúde (RSS), e abrangem os resíduos de procedência das diversas fontes potencialmente geradoras dos mesmos (CAFURE, PARTIARCHA, 2014). De acordo com a mais recente Resolução RDC nº 222, de 29 de março de 2018 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) que revogou a Resolução RDC nº 306, de 7 de dezembro de 2004 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), os resíduos dos serviços de saúde: resíduos de produtos hormonais, antimicrobianos,



antineoplásicos, imunossupressores, digitálicos, antirretrovirais, como também os resíduos dos medicamentos sujeitos a controle especial da portaria nº 344, de 12 de maio de 1998 do Ministério da Saúde: os entorpecentes, psicotrópicos, anabolizantes, retinóides; são classificados como resíduos do Grupo B – (Resíduos Químicos), que podem se apresentar no estado sólido ou líquido (BRASIL, 2004). Tanto a Resolução RDC nº 306, de 7 de dezembro de 2004 da ANVISA quanto a Resolução RDC nº 222 de 2018 da ANVISA, sendo esta última mais detalhada, prevê que todo estabelecimento gerador de resíduos deve elaborar um Plano de Gerenciamento de Resíduos de Serviço de Saúde (PGRSS), baseando-se nas classificações e características dos resíduos gerados, e estabelecendo diretrizes de manejo (BALBINO, BALBINO, 2012). A NBR 10004/2004 classifica os resíduos em classe I, como perigosos, os quais são caracterizados por alta periculosidade, e subdividem-se em resíduos tóxicos, corrosivos, inflamáveis, reativos e patogênicos, neste grupo estão inclusos os resíduos do Grupo B – resíduos químicos, e classe II, resíduos não perigosos (CHAGAS, 2012).

A forma inadequada de descarte de medicamentos, principalmente na rede de esgoto ou no lixo comum, pode gerar contaminação do solo, rios, lagos, oceanos, águas subterrâneas e lençóis freáticos. Quando expostas a condições de adversidade de temperatura, umidade e luz, essas substâncias químicas podem se transformar em tóxicas, afetando o equilíbrio ambiental, alterando ciclos biogeoquímicos e interferindo nas teias e cadeias alimentares. Como exemplo, pode ser citado o medicamento antimicrobiano, sulfametoxazol, que quando descartado de forma inadequada, aumenta a chance de favorecer o surgimento de bactérias cada vez mais resistentes, além de causar a contaminação aquática (FERREIRA; ABREU; RAPADO, 2019; RIBEIRO et. al., 2019; SILVA; MARQUES; GARCIA, 2019); e os hormônios presentes em anticoncepcionais,

principalmente os hormônios estrogênicos como: o 17 β -estradiol, estriol, estrona; bisfenóis, alquifenóis, ftalatos (hormônios sintéticos que mimetizam a ação dos estrogênios) em concentrações na grandeza de $\mu\text{g/L}$ e ng/L quando descartados de forma inadequada, principalmente em meio aquático, afetam o sistema endócrino e reprodutor de organismos aquáticos, ocasionando como exemplo a feminilização de peixes machos (PINTO, 2014; RAMOS et. al., 2017; SILVA; MARQUES; GARCIA, 2019).

O presente artigo visa explicitar como deve ser feito o descarte correto de resíduos de medicamentos pelas entidades que prestam serviços de saúde, apresentar ações e campanhas que estimulam o descarte correto de medicamentos tanto em estabelecimentos de saúde como em domicílio e destacar a importância do farmacêutico clínico nos estabelecimentos de saúde como mediador para estimular o uso racional de medicamentos.

METODOLOGIA

Classificação do estudo

Este estudo apresenta um caráter teórico, descritivo e exploratório com abordagem qualitativa dos fatos abordados a respeito do tema estabelecido, apresentando soluções para os problemas apresentados. O conteúdo reunido no presente artigo possui procedência de levantamento bibliográfico, cujo foi dada prioridade para bases de informação publicadas em monografias, dissertações de mestrado, artigos científicos, portarias e resoluções do ministério da saúde/ANVISA.

Levantamento bibliográfico

Para obtenção das referências bibliográficas: artigos científicos completos publicados em português, dissertações de mestrado, monografias, resoluções da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) foram utilizadas as bases de dados científicas: Scielo, Lilacs, e como auxílio o Google Acadêmico. O período

da pesquisa abrangeu 6 meses, de junho a dezembro de 2019. Para busca foram utilizados os descritores “descarte em farmácias e drogarias”, “descarte resíduos de medicamentos”, “logística reversa de medicamentos” “descarte no meio ambiente de medicamentos” “uso irracional de medicamentos”, “descarte de resíduos de serviços de saúde” os quais foram utilizados isoladamente ou em associação para refinar a busca.

Critérios de inclusão bibliográfica

O critério para seleção dos artigos encontrados foi verossimilhança com o eixo central do estudo, que é o descarte inadequado de resíduos de serviços de saúde por algumas farmácias e drogarias, além da relevância e fidedignidade das informações. Foram selecionados artigos publicados em português no período de 2009 a 2019. Ao todo foram selecionados 32 artigos científicos dos quais 13 foram utilizados na construção desse estudo, além de uma dissertação de mestrado, uma monografia, uma resolução da

Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) e uma portaria do Ministério da Saúde.

Critérios de exclusão bibliográfica

Foram excluídos do estudo 19 artigos científicos pesquisados. Os Critérios de exclusão foram artigos não disponibilizados na forma completa, ou seja, apenas disponível o resumo ou abstract, artigos publicados em anos inferiores a 2009 e artigos cuja relevância do tema não estava norteadada no descarte incorreto de resíduos de serviços de saúde.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Prejuízos à saúde humana e ao meio ambiente causados pelo descarte incorreto de resíduos de serviços de saúde

O descarte incorreto de medicamentos advém de uma série de fatores contribuintes, dos quais pode-se citar a ausência de um plano de gerenciamento de resíduos de serviços de saúde pelos estabelecimentos de saúde, o desconhecimento da população acerca do

Quadro 1 - Prejuízos à saúde humana gerados pelo descarte incorreto de fármacos

CLASSE FARMACOLÓGICA	MEDICAMENTO	PREJUÍZOS CAUSADOS A SAÚDE
Analgésicos e Anti-inflamatórios	Ibuprofeno, Paracetamol, Diclofenaco	Disfunções no trato gastrointestinal, hepáticas, renais, hematológicas
Antibióticos	Penicilina, Amoxicilina, Eritromicina e Sulfametoxazol	Risco de toxicidade, resistência bacteriana, hepatotoxicidade, nefrotoxicidade, teratogênese
Anti-hipertensivos (B Bloqueadores)	Propranolol, Atenonol	Reações cardiovasculares, neurológicas e reações respiratórias
Anticonvulsivantes	Carbamazepina, Felbamato, Fenobarbital	Sinais vitais instáveis, depressão respiratória e coma
Reguladores lipídicos	Estatinas, Fibratos	Constipação, flatulência, neuropatia e anemia
Antidepressivos	Fluoxetina, Risperidona	Ansiedade, agitação e náuseas
Hormônios	Contraceptivos orais	Tromboembolismo, hipertensão e cistos ovarianos
Anti-histamínicos	Loratadina, Cetirizina	Cefaléia, tontura e desconforto gastrintestinal
Citostáticos	Vimblastina, Bleomicina	Mutagênicos, carcinogênicos, teratogênicos, leucopenia, mielosupressão

Fonte: Adaptado de (SILVA, 2012).



descarte correto de medicamentos, o uso irracional de medicamentos, dentre outros fatores. É comum se observar em alguns estabelecimentos de saúde, como farmácias e drogarias, que não seguem um plano de gerenciamento de resíduos, o descarte de medicamentos à céu aberto, rios e lagos, sem nenhum tratamento prévio, acarretando prejuízos à saúde humana (Quadro 1) e ao meio ambiente tais como: promoção da resistência bacteriana e feminilização de peixes machos devido ao descarte incorreto de produtos hormonais (ALVARENGA, NICOLETTI, 2010; ALENCAR, 2014; CHAVES, 2014; SILVA; MARQUES; GARCIA, 2019).

O Descarte Correto de Resíduos de Serviços de saúde

Os medicamentos/insumos farmacêuticos vencidos ou utilizados em estabelecimentos de saúde devem ser segregados da embalagem e receberem destinação adequada. Segundo a Resolução RDC nº 222, de 29 de março de 2018 os resíduos do grupo B - Resíduos químicos gerados pelos estabelecimentos prestadores de serviços de saúde, quando em estado sólido não tratados devem ser dispostos em aterros sanitários de resíduos perigosos de classe I. O resíduo químico quando no estado líquido, deve ser submetido a um tratamento específico, como exemplo, solidificação do mesmo, antes de ser conduzido para a disposição final em aterros. É indevida a destinação de resíduo químico no estado líquido para o aterro sem passar por processo prévio de tratamento.

A inexistência de um programa de recolhimento de medicamentos vencidos ainda é uma realidade em muitos estabelecimentos de saúde, constituindo uma questão que agrava a dispersão dos princípios ativos dos fármacos no meio ambiente, refletindo em impactos ambientais de extrema relevância e interferência ecossistêmica (SOUZA, FALQUETO, 2015; RAMOS et. al., 2017).

Conduas para minimização do impacto socioambiental gerado pelo descarte inadequado de medicamentos

A falta de fiscalização por parte dos órgãos sanitários, muitas vezes favorece um ambiente propício para o surgimento de estabelecimentos de saúde que não contemplem um plano de gerenciamento de resíduos de serviços de saúde. Com isso, a associação da falta de profissionais devidamente capacitados nesses estabelecimentos com a escassez de campanhas explicativas, tornam-se uma força motriz que tange ao descarte inadequado de resíduos de medicamentos. É estabelecido ao setor produtivo, usuários e poder público pela Lei Nº 12.305, de 02 de agosto de 2010, a responsabilidade compartilhada na destinação correta dos bens de consumo e produtos, ao final do seu tempo de vida útil (PINTO, 2014).

Difícilmente são encontradas informações e ambientes adequados para o descarte de medicamentos nas mais variadas regiões do Brasil ou até mesmo em regiões próximas. Políticas como a logística reversa e campanhas de conscientização vem contribuindo para prestar maior esclarecimento sobre o descarte de medicamentos e tornar o processo de gerenciamento dos resíduos dos serviços de saúde mais eficaz (CHAVES, 2014).

Logística reversa

A logística reversa trata-se de uma política que visa o desenvolvimento social e econômico, sendo caracterizada por um conjunto de procedimentos, ações e meios que viabilizam a coleta e restituição de resíduos sólidos ao setor empresarial, reaproveitando ou destinando de maneira final de forma adequada ambientalmente (BRASIL, 2010). A Logística Reversa é mencionada como uma das alternativas para descarte correto dos resíduos de medicamentos. A mesma operacionaliza a retirada de seus produtos do mercado, tanto vencidos ou lotes contaminados e os que estão no fim de sua vida útil. Existindo esse mecanismo,

torna-se mais fácil a implantação de programas de entrega voluntária de medicamentos pela população às drogarias e farmácias, que encaminhariam aos distribuidores e estes, à indústria, para destinação final adequada (SOUZA, FALQUETO, 2015).

A política Nacional de Resíduos Sólidos (Lei 12.305/10) estabeleceu a Logística Reversa como um de seus instrumentos, visando à devolução de determinados resíduos para seus fabricantes, de forma que os mesmos insiram na sua cadeia produtiva o tratamento e a correta destinação final dos resíduos de medicamentos (BRASIL, 2010).

Campanhas para destinação adequada de resíduos de medicamentos

Inspiradas na política da logística reversa existem em alguns estabelecimentos de saúde como drogarias, farmácias das unidades básicas de saúde, ambulatórios e hospitais programas de recolhimento

de medicamentos. O estabelecimento de saúde disponibiliza um sistema de gerenciamento de resíduos no qual a população pode realizar o descarte de medicamentos vencidos ou não utilizados de forma segura e gratuita, evitando descartar em lixo comum e redes de esgotos, ou até mesmo que fiquem acumulados em casa. Os medicamentos são recebidos pelos funcionários do estabelecimento ou depositados em recipientes próprios para isso. Os resíduos são armazenados até a coleta por empresas especializadas para a destinação final adequada, seja em aterros de resíduos perigosos ou tratamento por incineração. No Brasil já existe alguns programas que realizam tais campanhas para coleta de resíduos de medicamentos em parcerias com redes de farmácias, drogarias e indústrias (Quadro 2) (MEDEIROS et. al., 2013).

Quadro 2 - Programas de descartes de medicamentos no Brasil e ações envolvidas

ESTADO/CAMPANHA/AGENTES	AÇÕES
SÃO PAULO/SP	
Descarte Correto de Medicamentos (Indústria Farmacêutica: Eurofarma; Grupo Pão de Açúcar)	Medicamentos arrecadados nas farmácias do grupo pão de açúcar; Resíduo destinado ao departamento de limpeza urbana
Descarte Consciente pela Empresa BHS; Farmácias da Rede Privada Indústria Farmacêutica	Medicamentos arrecadados nas farmácias. Resíduo destinado ao departamento de limpeza urbana
PORTO ALEGRE/RS	
Descarte Correto de Medicamentos vencidos (UFRGS); Unidade básica de saúde; Farmácia Popular do Brasil; Pró Ambiente	Medicamentos arrecadados nas UBS e farmácias comerciais com destinação final pela empresa pró ambiente
PARANÁ/PR	
Projeto de Coleta de Medicamentos Vencidos (Rede Coopera-farma; Colleta Ambiental)	Recebimento pela rede de Farmácias e destinação final pela empresa Coletta Ambiental
RIO DE JANEIRO/RJ	
Destino Consciente (Empresa BHS; Farmácias da Rede Privada; Indústria Farmacêutica)	Medicamentos coletados em farmácia pelo programa EcoMed e coleta por empresas especializadas para destinação adequada
BELO HORIZONTE/MG	
Centros de Saúde das Regionais do Município de Belo Horizonte	Recebimento e correta destinação dos medicamentos vencidos

Fonte: Adaptado de (MEDEIROS et. al., 2013).



É de grande relevância mencionar que as ações promovidas a fim de criar uma cadeia de descarte correto de medicamentos, além de chamaram a atenção dos órgãos sanitários para um maior olhar sobre o gerenciamento dos resíduos de saúde nos estabelecimentos que prestam assistência a comunidade, também corrobora para a manutenção da saúde do homem e a conservação de rios, lagos e outros nichos do meio ambiente. (BLANKENSTEIN, JÚNIOR, 2018).

Experiências internacionais que contribuem para o descarte correto de medicamentos

Na Espanha, o Sistema Integrado de Gerenciamento de Lixo é uma organização sem fins lucrativos com participação de 267 empresas farmacêuticas e farmácias como pontos de coleta, sendo financiado pela indústria farmacêutica com colaboração de farmácias e distribuidoras. O programa Cyclamed da França, iniciado em 1993, possui subsídio do Ministério da Saúde, com participação da indústria de reciclagem para coleta e disposição final dos resíduos de medicamentos. Em Portugal, o programa Valormed segue o princípio do poluidor pagador e funciona através de uma sociedade gestora de resíduos de embalagens e medicamentos coletados por farmácias, sendo paga uma taxa atual de 0,00512 euros por embalagem introduzida no mercado, levando o resíduo de medicamentos para incineração. Já na Suécia, o programa Apoteket, criado em 1970, com financiamento federal, a coleta dos medicamentos vencidos ocorre em farmácias, clínicas e consultórios e os mesmos são posteriormente incinerados (MEDEIROS et al., 2014).

A importância da farmácia clínica no descarte correto de medicamentos

A farmácia clínica é uma área de atuação do farmacêutico que está inserida no ciclo da assistência farmacêutica e que vem ganhando cada vez mais espaço no cenário farmacêutico, principalmente

dentro de hospitais, onde o principal papel do farmacêutico clínico é atuar na prevenção de problemas relacionados ao uso de medicamentos (PRMs). No entanto, a prática da farmácia clínica e da atenção farmacêutica também pode ser incluída no cotidiano das farmácias e drogarias, no momento em que o farmacêutico orienta o paciente sobre o uso de determinado medicamento, para qual finalidade o medicamento serve, qual a melhor maneira de administrá-lo, com ou sem alimento, dentre outras condutas, com isso, se estabelece um vínculo de confiança entre o farmacêutico e o cliente, propiciando um ambiente propício para o acompanhamento farmacoterapêutico.

Contudo, pode-se inferir que a farmácia clínica objetiva alcançar uma terapia eficaz, segura e com o menor custo possível para o paciente, respeitando os padrões de qualidade do medicamento, e é justamente nesse ponto que o farmacêutico clínico contribui para o uso racional de medicamentos, quando promove a dispensação da quantidade de medicamentos adequada para a terapia do paciente, quando divulga o que fazer com o medicamento adquirido caso ele vença ou caso o medicamento sobre, dentre outras medidas. Tais ações fomentam para um plano de gerenciamento de resíduos de serviços de saúde, principalmente os resíduos de medicamentos, que seja eficaz do ponto de vista social, econômico e ambiental (FERRACINI et. al., 2011).

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Nos últimos anos, o uso irracional de medicamentos tem expandido de maneira massiva. Os resíduos de medicamentos, quando dispostos de maneira incorreta, afetam o meio ambiente e a saúde humana. No Brasil, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) publicou a mais recente RDC - Resolução da diretoria colegiada nº 222 de 29 de março de 2018, que regula as boas práticas de resíduos de serviços da saúde, classifica o resíduo de medicamento em



resíduo químico, e dispõe sobre a correta destinação dos mesmos em aterros. No entanto, ainda existem poucas políticas que visam promover o descarte correto de medicamentos, além da falta de fiscalização por entidades sanitárias competentes, o que contribui para um descarte muitas vezes inadequado dos resíduos dos serviços de saúde. Com a finalidade de minimizar a ocorrência de problemas relacionados ao descarte incorreto de medicamentos, o governo, os estabelecimentos de saúde e a população devem atuar de forma conjunta, através do estímulo ao uso racional de medicamentos pelo farmacêutico clínico no ato da dispensação de medicamentos, maior fiscalização sanitária sobre o descarte de medicamentos nos estabelecimentos de saúde, denúncias por parte da população sobre descarte de medicamentos realizado de forma indevida, dentre outras ações; visando alcançar uma gestão de resíduos de medicamentos comprometida com a saúde humana e com a preservação do meio ambiente.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. ANVISA. Resolução RDC nº 306, de 7 de Dezembro de 2004. Brasília, acesso em: 05 de Julho de 2019. Disponível em: http://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/anvisa/2004/res0306_07_12_2004.html
- ALENCAR, T.O.S et al. Descarte de medicamentos: uma análise da prática no Programa Saúde da Família. *Ciência & Saúde Coletiva*, 19(7): 2157-2166, 2014.
- ALVARENGA, L.S.V.; NICOLETTI, M.A. Descarte doméstico de medicamentos e algumas considerações sobre o impacto ambiental decorrente. *Revista Saúde*, 4(3): 34-39, 2010.
- BALBINO, E. C.; BALBINO, M. L. C. O descarte de medicamentos no Brasil: um olhar socioeconômico e ambiental do lixo farmacêutico. *Revista Brasileira de Estudos Jurídicos*, 7(1): 88-100, 2012.
- BLANKENSTEIN, G. M. P.; JÚNIOR, A. P. O descarte de medicamentos e a política nacional de resíduos sólidos: uma motivação para a revisão das normas sanitárias. *Revista de Direito Sanitário*, 19(1): 50-74, 2018.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Portaria nº 344, de 12 de Maio de 1998. Brasília, acesso em: 05 de julho de 2019. Disponível em: http://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/svs/1998/prt0344_12_05_1998_rep.html
- CAFURE, V.; PATRIARCHA, G. S. Resíduos de serviço de saúde e seus impactos ambientais: uma revisão bibliográfica. *Interações*, 16(2): 301-314, 2015.
- CHAGAS, C.W.; GRACCO, A.S.D.S. A logística reversa de pós-consumo e a política nacional de resíduos sólidos derivados dos serviços de saúde. *Revista do Centro Universitário Newton Paiva*, 6(2): 14-22, 2012.
- CHAVES, A. M. M. Descarte de medicamentos e seus impactos socioambientais. 2014. Paraíba. 32 p. Monografia (Graduação), Departamento de Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal da Paraíba. Paraíba.
- FERRACINI, F. T et al. Implantação e evolução da farmácia clínica no uso racional de medicamentos em hospital terciário de grande porte. *Einstein*, 9(4): 456-460, 2011.
- FERREIRA, C.M.; ABREU, D.S.; RAPADO, L. N. Estudo relacionado ao Descarte de Medicamentos. *Rede*, 2: 84-93, 2019.
- MEDEIROS, M.S.G.; MOREIRA, L. M. F.; LOPES, C. C. G. O. Descarte de medicamentos: programas de recolhimento e novos desafios. *Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada*, 35(4): 651-662, 2014.
- PINTO, G. M. F et al. Estudo do descarte residencial de medicamentos vencidos na região de Paulínia (SP), Brasil. *Engenharia Sanitária Ambiental*, 19(3): 219-224, 2014.
- RAMOS, H. M. P et al. Descarte de medicamentos: uma reflexão sobre os possíveis riscos sanitários e ambientais. *Ambiente e Sociedade*, 20(4): 149-174, 2017.
- RIBEIRO, T.A et al. Avaliação do descarte adequado de medicamentos vencidos e não utilizados no município de Jacareí-SP. *Brazilian Journal of health Review*, 2(5): 4876-4882, 2019.
- SILVA, P.F.R. Resíduos de medicamentos nos RSU: riscos e consequências. 2012. Porto. 68 p. Dissertação (Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas), Faculdade de Ciências da Saúde, Porto.
- SILVA, L.O.; MARQUES, P. M.; GARCIA, G. P. P. Estrogênios no meio ambiente: seus efeitos na saúde humana e na biota aquática. *Sustentare*, 3(1): 75-92, 2019.
- SOUZA, C.P.F.A.; FALQUETO, E. Descarte de medicamentos no meio ambiente no Brasil. *Revista Brasileira de Farmácia*, 96(2): 1142-1158, 2015.

Percepção dos profissionais de uma unidade de Estratégia da Saúde da Família frente a pacientes que apresentam fatores de risco de suicídio

Perceptions of professionals of a Family Health Strategy unit regarding patients with risk factors for suicide

NEVES, F.V.¹; RIBEIRO, M.S.P.^{2*}; SILVA, P.C.¹; DE PAULA JR, W.²; DAMASCENO, E.M.A.¹

¹ Faculdades Unidas do Norte de Minas, Montes Claros – Minas Gerais, Brasil;

² Universidade Estadual de Montes Claros, Montes Claros – Minas Gerais, Brasil.

***Autor correspondente:** Magno Sinval Pereira Ribeiro

Universidade Estadual de Montes Claros - Centro de Ciências Biológicas e da Saúde

Av. Prof. Rui Braga, S/N – Vila Mauriceia, Montes Claros – MG, cep: 39401-089

E-mail: magnosribeiro@gmail.com

Telefone: +55 38 9 9922-3439

DOI: <https://doi.org/10.29327/226760.2.1-2>

RESUMO

O suicídio é um ato intencional com finalidade de dar fim a própria vida. É resultante de uma complexa interação de fatores. O acolhimento adequado à pacientes que apresentam ideias suicidas podem promover a qualidade de vida e promoção da saúde mental, e assim a recuperação. Deste modo, objetivou-se analisar a visão e a atuação da equipe multidisciplinar de uma Estratégia de Saúde da Família (ESF) acerca de pacientes com fatores de risco ao suicídio. Trata-se de um estudo qualitativo, transversal e descritivo. Foram realizadas entrevistas individuais de 10 minutos com quinze profissionais de diversas áreas da saúde de uma ESF, identificando os fatores de risco que mais acometem aos pacientes, a forma que são acolhidos na ESF e as medidas tomadas diante do comportamento suicida. As entrevistas foram transcritas e analisadas. Os fatores de risco mais relatados foram alcoolismo, depressão e conflitos familiares. De acordo os depoimentos, após o acolhimento os pacientes são encaminhados para psicólogo e médicos da ESF. Porém, de maneira geral, os profissionais relataram não possuir capacitações suficientes para lidarem com ações de saúde mental. É importante a atuação adequada da ESF no combate ao suicídio, uma vez que a atenção primária possui aceitação da população e causa um grande impacto positivo na saúde. São necessários processos de capacitações dos profissionais para assim possibilitar estratégias em seus processos de trabalho contra o suicídio.

Palavra-chave: Acolhimento, ideiação suicida, profissionais de saúde.

ABSTRACT

The suicide is an intentional act designed to end one's life. It is the result of a complex interaction of factors. Appropriate care for patients with suicidal thoughts can promote quality of life and promote mental health, and thus recovery. Thus, the objective was to analyze the vision and performance of the multidisciplinary team of a Family Health Strategy (FHS) about patients with risk factors for suicide. It is a qualitative, cross-sectional and descriptive study. Individual 10-minute interviews were conducted with fifteen professionals from different health areas of an FHS, identifying the risk factors that most affect patients, the way they are welcomed in the FHS and the measures taken in the face of suicidal behavior. The interviews were transcribed and analyzed. The most reported risk factors were alcoholism, depression and family conflicts. According to the statements, after receiving the patients were referred to psychologist and doctors of the FHS. However, in general, professionals reported not sufficient skills training to deal with mental health actions. The proper action of the FHS in the fight against suicide is important, since primary care has acceptance of the population and has a great positive impact on health. Professional training processes are necessary to enable strategies in their work processes against suicide.

Key words: Reception, suicidal ideation, health professionals.



INTRODUÇÃO

Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS) o suicídio é um ato intencional e consciente, com o intuito de dar fim a própria vida, sendo difícil explicar o motivo que leva algumas pessoas a cometerem tal ato, enquanto outras em situação similar ou pior não o fazem. É resultante de uma complexa interação de fatores biológicos, sociais, psicológicos, ambientais e aqueles ligados à história particular do indivíduo. Assim, é possível admitir que o suicídio é um fenômeno complexo, com várias origens e motivos (LEMOS, SALLES, 2017).

Para chegar ao suicídio propriamente dito, alguns hábitos são desencadeados e são descritos como ideações suicidas, caracterizadas por pensamentos, desejos e ideias em relação a morte, onde o aparecimento dessas ideações apontam para uma maior observação e avaliação dos ímpetus no contexto do indivíduo. O suicídio é considerado um problema de saúde pública e as ideações suicidas entram na categoria de risco para a saúde, pois antecedem o ato, se configurando como o primeiro passo desse processo de comportamento e tentativa de autoextermínio. As imaginações em relação a morte podem estar relacionadas às consequências desfavoráveis de episódios enfrentados na vida (ALCÂNTARA et al., 2018).

A palavra suicídio deriva etimologicamente do latim, onde *sui* (si mesmo) e *caedes* (ação de matar) significam morte intencional auto imposta. O comportamento suicida existe desde os tempos mais antigos da humanidade e ao longo dos tempos tem sido alterado apenas a forma como esse ato é visto. Os principais fatores associados são: histórico de suicídio na família, doenças mentais (principalmente depressão, ansiedade, esquizofrenia, abuso, dependência de álcool e drogas), ausência de apoio social, tentativas anteriores de suicídio, forte intenção suicida, eventos estressantes, características sociais

e demográficas, tais como desemprego, pobreza e baixo nível educacional (MOREIRA, BASTOS, 2015).

A maioria das pessoas tem medo da morte, porém, para aquelas que estão em condições vulneráveis e não encontram nenhuma alternativa para resolver seus problemas, a morte é vista como meio de aliviar o sofrimento e através do comportamento de autoextermínio buscam acabar com a própria vida. O suicídio é uma das principais causas de morte no mundo, com um total de 800 mil mortes anuais, onde 79% ocorrem em países de baixa e média renda, sendo a segunda principal causa de morte entre jovens de 15 a 29 anos de idade (OPAS/OMS, 2018). A taxa média mundial de suicídio são de 16 óbitos por 100 mil habitantes (OPAS/OMS, 2018). No Brasil, nos últimos anos a taxa média de suicídio aumentou 60%, caracterizando 5,7 óbitos por 100 mil habitantes, sendo a terceira causa de morte por motivações externas no país (OLIVEIRA et al., 2017). Dados pontuam a importância da prevenção e do tratamento adequado de transtornos mentais e comportamentais como estratégia para a redução do suicídio (LEMOS, SALLES, 2017). Diante disso, o presente trabalho tem como objetivo analisar a visão e a atuação da equipe multidisciplinar de uma Estratégia de Saúde da Família acerca de pacientes com fatores de risco ao suicídio.

Metodologia

Estudo qualitativo, transversal e descritivo, desenvolvido com profissionais de diferentes formações na área da saúde de uma Estratégia de Saúde da Família (ESF) no município de São João da Lagoa, Minas Gerais. Por se tratar de uma pesquisa que envolve seres humanos, esta se iniciou após a aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa com parecer nº ETIC 3.141.487/2019.

A coleta dos dados por meio de entrevistas/questionários foi realizada com instrumento validado, nos meses de abril e maio de 2019.



Foram utilizados como critérios de inclusão todos os profissionais da área da saúde que atuam na ESF onde a pesquisa foi realizada e que assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE). Como critérios de exclusão os profissionais da saúde que recusaram assinar o TCLE e que estavam ausentes no dia da coleta dos dados. Os participantes foram mantidos em anonimato, sendo identificados pela letra P seguido de um número.

O questionário foi norteado através do Manual para Profissionais da Saúde em Atenção Primária da Organização Mundial de Saúde e foi aplicado a todos os voluntários. A amostra incluiu quinze profissionais da área da saúde atuantes na ESF, sendo cinco enfermeiros, três médicos, dois dentistas, um psicólogo, uma farmacêutica, duas fisioterapeutas e um nutricionista, todos com idades variadas, diferentes especializações e com tempo de exercício da profissão distinto.

A partir dessa variedade de características, procurou-se captar uma significativa variabilidade de depoimentos mediante entrevistas semi-estruturadas, baseadas em um roteiro composto por temas abertos, que permitissem aos entrevistados discorrerem livremente sobre o tema.

As entrevistas individuais foram feitas pelos pesquisadores, em local previamente selecionado para esse fim, com duração de até 10 minutos e todas foram iniciadas com a mesma pergunta: "Você já participou de alguma capacitação em relação a transtornos mentais e outros fatores de risco com ideação suicida?"

Embora, a princípio, essa pergunta possa ser considerada como indutora da confirmação da importância da qualificação profissional nesse âmbito, optou-se por tal abordagem tendo em vista que a amostra de profissionais foi retirada de uma ESF onde não é realizado um trabalho sólido para minimizar as taxas de suicídio e os danos associados às tentativas

suicidas. Além disso, é importante haver uma rede organizada de serviços que possam acolher as demandas evidenciadas pelos profissionais e pessoas próximas, identificando fatores determinantes, preditivos e assim minimizar a prevalência desses eventos.

Contrariamente a uma generalização dos conceitos teóricos testados, a abordagem qualitativa, adotada neste trabalho, permitiu maior aprofundamento e abrangência da compreensão do grupo social em estudo. Portanto, em detrimento do critério numérico, privilegiou-se a capacidade da pesquisa refletir a totalidade das múltiplas dimensões das situações vivenciadas. Foram selecionados sujeitos sociais que detinham os atributos que os investigadores pretendiam conhecer, cuja interpretação era mais importante que a simples mensuração de dados.

Nas entrevistas, buscou-se investigar os fatores de risco que mais acometem aos pacientes e a forma que são acolhidos na ESF, bem como as medidas tomadas pelos profissionais diante dos pacientes com comportamento suicida.

Todas as entrevistas foram ouvidas e tiveram sua transcrição lida exaustivamente, segundo o preconizado. Na análise utilizou-se a técnica da análise do conteúdo, que permite a construção de categorias temáticas, pelo reconhecimento de ideias centrais dos textos em estudo, com suporte do programa Atlas/Ti 5.0, software que trata e analisa dados qualitativos. Os dados sociodemográficos foram analisados pelo programa estatístico PASW (Statistical Package for Social Sciences) 20.0.

Resultados e discussão

Dos quinze profissionais entrevistados, 60% eram do gênero feminino. A faixa etária dos voluntários variou de 22 anos a 60 anos, com predomínio de 22 à 29 anos (46,7%). Do total de participantes, 86,7% possuíam apenas graduação e 73,3% de um a cinco anos de exercício da profissão.



Dos quinze relatos obtidos, nove profissionais expuseram que já participaram de capacitações sobre transtornos mentais e fatores de risco com ideação suicida.

A análise do conteúdo desenvolvida segundo o Manual para Profissionais da Saúde em Atenção Primária da Organização Mundial de Saúde e a categorização dos relatos elaborados pelos pesquisadores, permitiram a construção de quatro temas ou núcleos de sentido: acolhimento multiprofissional aos pacientes, fatores de risco, classificação de graus de risco e encaminhamento a outros profissionais de saúde, que são discutidos a seguir.

Acolhimento multiprofissional aos pacientes

O amparo aos indivíduos com histórico suicida ou que apresentam um ou mais fatores de risco nos centros de atenção primária é fundamental, pois se feito com preparo e prontidão é possível aumentar a aceitação e adesão do paciente ao tratamento (GUTIERREZ, 2014).

Durante o acolhimento, os profissionais devem demonstrar empatia e respeito pelo sentimento do outro, ser afetuoso e dar apoio, não podendo tratar o problema como trivial. Os profissionais (P) relataram como conduzem o acolhimento de pacientes que apresentam um ou mais fatores de risco a ideação suicida:

“Eu melhorei nesse quesito depois que tive contato com uma paciente que desde o primeiro contato, apresentava muito mau humor, reclamava muito e sempre negativa e ela veio a se suicidar. Então nas minhas abordagens quando o paciente diz que não está bem com frequência, reclama muito, eu pergunto se tá acontecendo alguma coisa e oriento esse paciente”. (P05 – Fisioterapeuta)

“Eu converso muito, pergunto se está acontecendo alguma coisa, mas acho que não querer falar é até uma característica de quem tem depressão ou

alguma condição, querem resolver tudo logo e ir embora”. (P06 – Dentista)

“Converso sobre o assunto de acordo com que demonstram e dizem os pacientes, explico que precisam procurar ajuda tentando deixar ele o mais tranquilo possível para que não rejeite os tratamentos, oriento para procurarem o médico e psicólogo”. (P09 – Farmacêutica)

Muitos participantes relataram sobre o encaminhamento a outros profissionais quando abordados sobre o acolhimento:

“A maioria das vezes são mais relatadas por familiares, as vezes a pessoa não comenta sobre o problema na consulta de enfermagem, e através dos relatos de familiares eu encaminho pra psicóloga ou médico clínico geral”. (P04 – Enfermeira)

“Eu encaminho para o psicólogo”. (P06 – Dentista)

“Quando eu percebo algum sinal eu faço encaminhamento”. (P10 – Médica)

Fatores de risco

Os principais fatores associados ao suicídio são: histórico de suicídio na família, doenças mentais (principalmente depressão, ansiedade, esquizofrenia, abuso, dependência de álcool e drogas), ausência de apoio social, tentativas anteriores de suicídio, forte intenção suicida, eventos estressantes, características sociais e demográficas, tais como desemprego, pobreza, e baixo nível educacional (MOREIRA, BASTOS, 2015).

Em relação aos fatores de risco que mais acometem aos pacientes à tentativa suicida, a maior parte dos entrevistados relataram depressão, alcoolismo e conflitos familiares:

“Muitas vezes percebo uma predisposição do paciente ao suicídio e ocorre situações que funcionam como gatilho para que o suicídio aconteça. Nos pacientes com ideação suicida eu consegui identificar que os



fatores de risco que mais acometem estes pacientes são: depressão, ansiedade e conflitos familiares, e muitas vezes um fator está relacionado a outro". (P01 – Psicóloga)

"Estrutura familiar que afeta principalmente os adolescentes, além da condição financeira e alcoolismo". (P04 – Enfermeira)

"Ansiedade, e vejo muitos jovens e crianças muito tristes, que aparentam ter algum problema na estrutura familiar e condição social". (P06 – Dentista)

"Depressão, estrutura familiar, doenças crônicas, alcoolismo, sobrecarga de responsabilidades em sua maioria relatadas por mulheres que além do trabalho cuidam dos filhos e mãe e/ou pai idosos". (P09 – Farmacêutica)

"Doenças crônicas, frustrações amorosas e profissionais, depressão, ansiedade, limitações por alguma doença crônica". (P05 – Fisioterapeuta)

Classificação de graus de risco

Para aumentar a eficácia no manejo de pacientes em situações de risco é utilizada uma classificação de urgência dividida em: alta, quando há planejamento claro e intencionalidade de realizar o suicídio nas próximas horas ou dias, média, onde ocorrem os planos suicidas factíveis, mas o paciente projeta a ação no futuro, caso a anormalidade não se modifique favoravelmente, por fim, baixa, caracterizada pela ideação suicida, mas sem planejamento característico e com baixa intencionalidade, sendo que o paciente ainda consegue encontrar alternativas para lidar com seu sofrimento. É visto como violência e agressividade, sendo categorizado como "causa externa" pela 10ª Classificação Internacional de Doenças (CID) (RIBEIRO et al., 2018).

As ações para cada tipo de grau vão de acolhimento, encaminhadas ao médico e psicólogo, até não deixar a pessoa sozinha, contatando a família e acompanhamento com o psiquiatra. Durante

a entrevista os participantes responderam se concordam que cada grupo de risco deve ter tratamentos diferentes e de acordo com os seus conhecimentos quais as medidas para cada um desses grupos de risco:

"Sim, concordo que o tratamento deve ser diferente para cada grau de risco. Em todos os casos é necessário um acolhimento ao paciente, quando apresenta grau de risco baixo é necessário organizar um plano de intervenção com atendimentos semanais, visitas domiciliares, incluir a família para monitorar este paciente. No grau de risco médio, além do monitoramento da família e atendimentos com intervalos menores, é necessário o encaminhamento para serviços de especialistas e medicação. Já no grau de risco mais alto é necessário que este paciente esteja sempre na companhia de outra pessoa, nunca deixa-la sozinha, ter visitas domiciliares, atendimento constante, encaminhamento ao psiquiatra para avaliação e medicação, atendimento a família do paciente e monitoramento". (P01 – Psicóloga)

"Com certeza. Nesse caso eu acho que tem a questão da frequência das consultas com o psicólogo, nos graus de risco baixo, médio e alto são diferentes, e no caso pessoas que se encontram no grupo de risco alto tem a associação da terapia com o acompanhamento com o psiquiatra". (P04 – Enfermeira)

"Concordo. Quando o paciente já tem ideação suicida já está começando a planejar o ato e não podemos relativizar tratando como se não fosse nada, tento tratar a doença de base. E se a pessoa tiver algum sintoma psicótico pode-se considerar de moderado a grave dependendo do grau, então se tem transtornos, delírios persecutórios, alucinações visuais/auditivas, as vezes há a necessidade de internação compulsória, por que essa pessoa pode sair do consultório e tentar o autoextermínio, inclusive muitas vezes é necessário usar até de força policial pra conter a pessoa, dependendo do grau, nos mais avançados".



(P15 – Médico)

A maioria dos participantes desconheciam a classificação dos graus de risco e as medidas para cada grupo, claramente tais constatações podem ser feitas com base nas falas a seguir:

“Eu não classificaria em graus de risco não. No caso de depressão mesmo qualquer um deles apresentam riscos, mas nos casos que já houve tentativas os pacientes são mais propícios a cometerem o suicídio”. (P02 – Enfermeiro)

“Sim. Mas pra gente que não é da área é difícil dizer quais são as medidas necessárias para cada grupo de risco”. (P06 – Dentista)

“Com certeza. Não sei te responder quais são as diferenças que há nos tratamentos dos 3 grupos”. (P08 – Enfermeiro)

Encaminhamento a outros profissionais de saúde

O papel dos profissionais da equipe multidisciplinar da atenção primária é elemento fundamental para o alcance dos objetivos e de garantia dos direitos aos portadores de transtornos mentais. Os serviços de atenção primária são, geralmente, os mais acessíveis, disponíveis e aceitos pelas comunidades (WENCESLAU, ORTEGA, 2015). Além do acolhimento, a equipe multidisciplinar deve estar preparada para desenvolver ações de socialização e prevenção dos possíveis agravos dos pacientes da sua área de abrangência, como por exemplo, gerar e estimular atividades ou orientações em grupo com a população (adoecida ou não) e seus familiares, intervenções domiciliares para diminuição da sobrecarga da família cuidadora (SILVA et al., 2016).

Para fazer um encaminhamento é necessário que o profissional tenha tempo para explicar ao paciente qual a razão e importância da presença na consulta. Os participantes relataram situações em que percebem a necessidade do encaminhamento a outros profissionais e a maneira que os conduzem:

“Quando o paciente relata sintomas como desejo de isolamento, pensamentos negativos relacionados à saúde mental, quando eu vejo que o paciente tá numa crise na triagem eu já encaminho ele diretamente para o atendimento médico, também já encaminhei pacientes para atendimento com a psicóloga do NASF”. (Núcleo Apoio à Saúde da Família). (P02 – Enfermeiro)

“Em casos de pacientes que apresentam crises de ansiedade ou estão com sintomas de depressão e ainda não passaram pelo médico ou psicóloga. Pacientes que são muito atarefados principalmente cuidadores de idoso. Pacientes que relatam ideias suicidas e pensamentos negativos. Oriento como esse paciente pode marcar uma consulta com o médico e psicólogo, e peço a ele que faça isso o mais breve possível. Falo sobre a situação com a enfermeira responsável pela coordenação da ESF e com o agente de saúde ou familiar do paciente para que reforcem a necessidade da busca de ajuda. E quando esse paciente retorna novamente abordo sobre o assunto para confirmar se ele buscou atendimento dos profissionais”. (P09 – Farmacêutica)

“Nos casos que eu vejo que tem uma dificuldade em relação à família, ou um cônjuge, em um luto, por exemplo, eu encaminho para a psicóloga que vai discutir sobre essas relações, e também ocorre o oposto, a psicóloga me manda ou conversa comigo pra avaliar se esse paciente precisa de outra abordagem. E quando é um caso mais grave onde houver uma tentativa de suicídio encaminho para o psiquiatra e tem casos que peço o retorno desse paciente após dois ou três meses pra eu avaliar se o tratamento tem sido eficaz. Faço o encaminhamento por escrito e converso com o paciente sobre a importância disso, e digo que é importante a consulta com o psiquiatra para se sentirem melhor, reforço a questão dos vínculos familiares como, por exemplo, a chegada de um neto para que a pessoa entenda que ela é importante no mundo”. (P14 – Médico)



CONCLUSÃO

Conclui-se que a atuação da equipe multiprofissional da Estratégia de Saúde da Família é de fundamental importância no acolhimento, tratamento e direcionamento dos pacientes que apresentam fatores de risco ao suicídio, além disso, através das entrevistas os profissionais relataram não possuir capacitações suficientes para lidarem com ações de saúde mental na ESF, sendo necessário a potencialização nos processos formativos dos profissionais, pautada nas diretrizes da Política Nacional de Educação Permanente em Saúde. Portanto, a presente pesquisa identificou a visão de profissionais de uma ESF acerca da atuação à pacientes que apresentam fatores de risco de suicídio, possibilitando assim uma estratégia em seus processos de trabalho.

AGRADECIMENTOS

Agradecemos a Universidade Estadual de Montes Claros e a Faculdades Unidas do Norte de Minas pelo apoio científico e financeiro.

Declaração de conflito de interesse: Nada a declarar.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALCÂNTARA, M.R.O.; MARANHÃO, T.L.G.; MARINHO, A.O.O.; MACEDO, L.C. O papel do cuidador na identificação dos fatores relacionados ao suicídio de idosos. *Id on Line Rev. Multidisciplinar e de Psic.*, 12(39): 674-694, 2018.

GUTIERREZ, B.A.O. Assistência hospitalar na tentativa de suicídio. *Rev. Psicologia USP*, 25(3): 262-269, 2014.

LEMOS, M.F.L.; SALLES, A.M.B. Suicídio no campo da psicologia: análise das metodologias de estudos disponíveis na base de dados scielo. *Cadernos Bras. de Saúde Mental*, 9(23): 84-104, 2017.

MOREIRA, L.C.O.; BASTOS, P.R.H.O. Prevalência e fatores associados à ideação suicida na adolescência: revisão de literatura. *Rev. Psicol. Esc. Educ.*, 19(3): 445-453, 2015.

OLIVEIRA, A.M.; BICALHO, C.M.S.; TERUEL, F.M.; KAHEY, L.L.; BOTTI, N.C.L. Comportamento suicida entre adolescentes: revisão integrativa da literatura nacional. *Rev. Adolesc. e Saúde*, 14(1): 88-96, 2017.

OPAS/OMS BRASIL. Folha informativa – suicídio, 2018. Disponível em: https://www.paho.org/bra/index.php?option=com_content&view=article&id=5671:folha-informativa-suicidio&Itemid=839. Acesso em: 18 de junho de 2019.

RIBEIRO, N.M.; CASTRO, S.S.; SCATENA, L.M.; HAAS, V.J. Análise da tendência temporal do suicídio e de sistemas de informações em saúde em relação às tentativas de suicídio. *Rev. Texto Contexto Enferm.*, 27(2): 1-11, 2018.

SILVA, G.R.; REIS, H.F.T.; SANTOS, E.M.; SOUZA, M.P.A.; AZEVEDO, R.L. Saúde mental na atenção primária à saúde: percepções da equipe de saúde da família. *Rev. Cogitare Enferm.*, 21(2): 01-08, 2016.

WENCESLAU, L.D.; ORTEGA, F. Saúde mental na atenção primária e saúde mental global: perspectivas internacionais e cenário brasileiro. *Rev. Interface Com. Saúde e Educ.*, 19(55): 1121-1132, 2015.



Development of nanostructured lipid carriers containing finasteride

Desenvolvimento de carreadores lipídicos nanoestruturados contendo finasterida

PALMIERI, M.G.S.¹; FERREIRA, K.C.B.¹; VALLE, A.B.C.S.¹; ALEIXO, D.T.¹; TAVARES, G.D.¹; CORRÊA, J.O.A.¹; PITTELLA, F.^{1*}

¹ Federal University of Juiz de Fora, Faculty of Pharmacy, Juiz de Fora, Minas Gerais, Brazil.

***Corresponding Author:** Frederico Pittella; Rua José Lourenço Kelmer, s/n - São Pedro, MG, 36036-900 UFJF, Faculdade de Farmácia; frederico.pittella@ufff.edu.br; 32 2102-3802

DOI: <https://doi.org/10.29327/226760.2.1-3>

Abstract: Beyond its aesthetic importance, the hair distinguishes the individual and can influence the social acceptance. Under certain circumstances, the normal hair growth process is impaired by a condition called androgenetic alopecia (AGA). Among the drugs used to treat AGA, finasteride is an anti-androgenic steroid, used both orally and topically. Nevertheless, it has been reported that both forms results in side effects such as irritation, contact dermatitis and mood changes. Nanostructured lipid carriers incorporating finasteride were developed in this study, in order to evaluate its main characteristics considering size, zeta potential, polydispersity index, encapsulation efficacy and cytotoxicity. Such nanoparticles were built with lipids from vegetable source and block copolymers. They were adjusted to release the drug using specific temperature as trigger. After preparation through high shear technique, the lipid nanocarriers produced exhibited hydrodynamic diameter with average size of 119.56 ± 1.07 nm and polydispersity index of 0.186. Encapsulation efficiency reached values close to 100% after HPLC quantification. The suspension kept their characteristics through 30 days, showing good stability. In addition, the nanostructures reduced the finasteride cytotoxicity for fibroblasts and keratinocytes cells. In this way, the obtained formulation becomes a good *candidate* for future *in vivo* tests as topical agent against AGA showing high encapsulation efficiency and lower cytotoxicity when compared to finasteride alone.

Keywords: nanocarrier, finasteride, androgenetic alopecia.

Resumo: Além de sua importância estética, o cabelo distingue o indivíduo e pode influenciar sua aceitação social. Sob certas circunstâncias, o processo normal de crescimento do cabelo é prejudicado por uma condição chamada alopecia androgenética (AGA). Para tratar a AGA, um esteroide antiandrogênico chamado finasterida pode ser usado de duas formas: oral ou tópica. Porém, para ambas as formas, efeitos colaterais como irritação, dermatite de contato e alterações no humor tem sido reportados. Carreadores lipídicos nanoestruturados incorporando finasterida foram desenvolvidos neste estudo com o intuito de avaliar suas principais características, considerando o tamanho, o potencial zeta, o índice de polidispersão, a eficiência de encapsulação e a citotoxicidade. Tais nanopartículas foram construídas com lipídeos de origem natural ajustados para liberação em temperatura definida e estabilizados com copolímeros em bloco. Após preparação através de alto-cisalhamento, os nanocarreadores lipídicos produzidos possuíam diâmetro hidrodinâmico médio de $119,56 \pm 1,07$ nm com índice polidispersividade em 0,186. A eficiência de encapsulação atingiu valores próximos a 100%, conforme quantificação por HPLC. A suspensão manteve suas características durante 30 dias, demonstrando boa estabilidade. Em adição, as nanoestruturas produzidas reduziram a citotoxicidade da finasterida frente a células de fibroblastos e queratinócitos. Desta forma, a formulação obtida se torna um bom *candidato* para futuros testes *in vivo*, como agente tópico contra a AGA.

Palavras-chave: nanocarreadores, finasterida, alopecia androgenética.



INTRODUCTION

The formation of the hair begins in the follicle which is basically a mini-organ composed by multiple layers capsulating and producing the hair shaft that is projected through the epidermis. The internal and external root sheath envelops the hair shaft, while in the follicle base the dermal papilla is surrounded by matrix cells that proliferate and differentiate to form the hair shaft. The hair bulge is located in the middle part, where the sebaceous gland and the erector muscle are found (JI et al., 2017; NILFOROUSHZADEH et al., 2019).

Hair loss is a problem for both men and women. This condition cannot be considered only an aesthetic issue but also a clear health impairment, resulting in reduced self-esteem and anxiety that can trigger depression. One of the most common causes of hair loss is the androgenetic alopecia (AGA), a physiological imbalance that affects half of Caucasians males and nearly 100% of the same population over 80 years old. In addition, 15 to 30% of women around thirty years old also suffer from hair loss (GOMES et al., 2014; HAMISHEHKAR et al., 2016; MADHESWARAN et al., 2013; PEREIRA et al., 2018). In the case of AGA, the follicles of the scalp show high levels of 5 α -reductase. This enzyme converts testosterone in di-hydrotestosterone (DHT), which binds to the androgenic receptor, stimulating genes responsible for the development of AGA, which in turn reduces the size of hair follicles. There are several genes related to AGA, but the ones that have a major relationship are the *locus* AR/EDA2R in the X chromosome and the *locus* on the short arm of the chromosome 20, 20p11 (MADHESWARAN T. et al., 2013; HAMISHEHKAR et al., 2016; LOLLI et al., 2017).

The pharmacological therapies available currently for AGA treatment include the topical or oral administration of finasteride (SCOW, NOLTE, SHAUGHNESSY, 1999). Finasteride is commonly used in the treatment of

hair loss. This synthetic molecule has anti-androgenic properties that inhibit, in a competitive way, the type 2 5 α -reductase enzyme, blocking the conversion of testosterone in DHT. This substance is chemically classified as 4-asa-3-oxosteroid and can be used orally for benign prostatic hyperplasia treatment and/or topically for AGA (CAON et al., 2014). Finasteride can reduce over 60% of the local levels of DHT when in contact with the scalp (PRICE, 1999; CAON et al., 2014).

The current available treatment for AGA shows topical formulations prepared with large amount of ethyl alcohol and/or propylene glycol, which can cause side effects such as irritation, dandruff, contact dermatitis and allergies. Another disadvantage of topical solution is the necessity of repeated application to assure correct dosage administration (MATOS et al., 2015; KAUL et al., 2018; PEREIRA et al., 2018; RAMEZANI et al., 2018). In addition to topical treatments, the systemic therapies with finasteride result in adverse effects such as mood changes, gynecomastia, decreased libido and erectile dysfunction or impotence (MADHESWARAN T. et al., 2013). Moreover, the results of systemic treatment can disappear as soon as the treatment stops (PRICE, 1999).

Therefore, formulations that minimize the problems in AGA treatment are of great importance. The control of materials in nanometric scale allow the construction of nano-particles that can incorporate and release the drug in specific physiologic conditions, allowing their use as drug nanocarriers. There is a growing interest in the development of nanocarriers capable of passing through the corneal extract and deliver the substance in the site of action (MADHESWARAN et al., 2014).

The objective of the use of these nanostructures in therapies is to transport molecules to specific sites and deliver them with an effective therapeutic dosage. Nanocarriers show great advantages when compared with classic technologies, because they allow drug



dissolution above their standard solubility limits. In addition, they promote higher therapeutic efficiency through prolonged drug release (BARUA; MITRAGOTRI, 2014).

Nanostructured lipid carriers (NLC) have been studied to increase the efficiency of drugs in several diseases, and it is used in medicines including products for topical application. Among the different lipid nanocarriers described, NLC can be prepared using solid lipids at room temperature, suspended in aqueous medium and stabilized by surfactants (SOUTO; NAYAK; MURTHY, 2011).

This study intends to develop NLC incorporating finasteride to achieve higher drug penetration through the skin and consequent improve therapeutic potential (CAON et al., 2014; HAMISHEHKAR e al., 2016; KAUL et al., 2018). As an alternative to the use of synthetic lipids, lipids extracted from the seeds of *Passiflora incarnata* were used due to their naturally balanced fatty acid composition, which consequently produces imperfect crystalline nuclear structure supporting increased drug encapsulation (BATTAGLIA; GALLARATE, 2012).

2. MATERIAL AND METHODS

2.1. Natural lipid characterization by gas chromatography with flame ionization detector (GC-FID)

Natural lipids samples were prepared through hydrolysis and methylation, prior to the analysis by gas chromatography with flame ionization detector (GC-FID) (Agilent). A SUPELCOWAX-10 column 15m x 0.2mm x 0.2 μm (SUPELCO) was used with gradient temperature: 60°C at time zero, then increments of 10°C per minute to 240°C; injector (split 1/50) was set at 250°C and detector at 260°C. Hydrogen was used as carrier gas (4.0 mL/min) with injection volume of 1mL. Peak identification was made by comparison to Supelco37 Fame mix methylated fat standards

(Supelco). EZChrom Elite Compact (Agilent) program was used to acquire experimental data.

2.2. Preparation of nanostructured lipid carriers

Nanoparticles were prepared using modified high pressure homogenization technique (SOLDATI et al., 2018). Firstly, lipids extracted from *Passiflora incarnata* seeds (Lot PFB018/03, Ebpm Comercial Ltda, Brazil) and finasteride (Infinity Pharma, São Paulo, Brazil) were prepared as the organic phase (10:1 w/w). This phase was mixed and heated at 60 °C for 10 minutes. In a separate flask, the aqueous phase containing Pluronic F127 (Sigma-Aldrich) was also heated at 60 °C for 10 minutes. Afterwards, the oil phase was subjected to agitation (12.000 rpm) followed by the addition of aqueous phase to the oil phase under ultrasonic irradiation (100W). The suspension was incubated at room temperature for 24 hours to allow lipidic nucleus solidification.

2.3. Nanoparticles characterization

2.3.1. Dynamic Light Scattering (DLS) and electrophoretic mobility

Samples of NLC were characterized by dynamic light scattering and electrophoretic mobility to evaluate the hydrodynamic diameter, polydispersity index (Pdl) and Zeta potential, using Zetasizer NanoZS equipment (Malvern Instruments, UK). The hydrodynamic diameter and Pdl were measured using a He-Ne (633 nm) laser in detection angle of 173° degrees using quartz cell (ZEN2112) at 25°C. Zeta potential values were determined through electrophoretic mobility evaluation, by the Smoluchowski equation. Prior to characterization, samples were diluted (1:400, v/v) in distilled water to obtain the adequate condition to light scattering. Measures were performed in triplicate at room temperature soon after preparation and after 30 days upon storage.



2.3.2. Encapsulation Efficiency (EE)

Encapsulation efficiency (EE) was determined indirectly through finasteride quantification in the supernatant after centrifugation, by high pressure liquid chromatography (HPLC/ UV-Vis) using a Shimadzu® LCMS-IT-TOF. NLC was centrifuged at 15000 rpm for 15 minutes and 100 µL of supernatant was collected for analysis. Two solutions were prepared for chromatographic separation. Phase "A" was composed by acetonitrile and phase "B" by water; both phases were degassed in ultrasound prior to analysis. A column "Supelco ODS" (250 mm x 4,6 mm, 5 µm) was used. A linear gradient was performed in which phase B raised from 10% in 0,01 minute to 80% when elution time reached 15 minutes and to 100% in 20 minutes of elution. Phase B concentration was kept in 100% for 7 minutes. Flow rate was 1,0 mL/min and wavelengths analyzed were 245 nm e 254 nm respectively. Finasteride standard was solubilized in methanol, and the calibration curve was built from 0.025 to 0.5 mg/mL.

2.4. Cellular viability after treatment with NLC

Cellular viability of *Mus musculus* fibroblasts (L929) and human keratinocytes (HaCaT) was evaluated by MTT assay, after the treatment with NLC containing finasteride. Cells were cultivated in 5% CO₂ atmosphere at 37 °C. Further, cells were seeded to 96 well plates with cellular density of 5 x 10³ (L929) and 5 x 10⁴ (HaCaT) cells/mL for 24 hours prior to treatment. Further, NLC containing finasteride was applied to the final concentration range of 6.2-100 µg/mL and plates were incubated for another 24 hours at 37 °C with 5% of CO₂. Then medium was removed and MTT solution (5 mg/mL) diluted in medium (1:10) was added followed by an incubation period (4 h at 37 °C). The formazan crystals formed after that period were dissolved in 100 µL of DMSO and absorbance was read at 540 nm

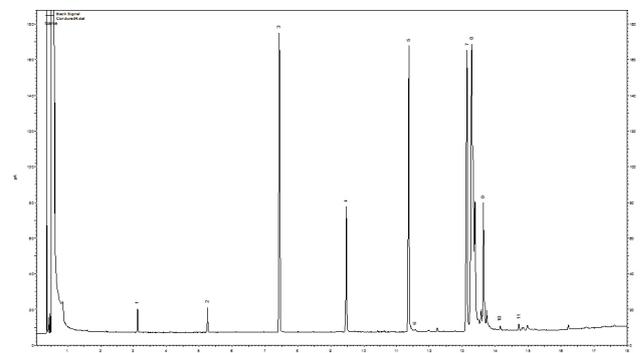
in microplate reader (Spectramax 190). Non-treated controls were considered as 100% of cell viability (MOSMANN, 1983).

2.5. Statistical analysis

All experiments were analyzed through the one way variance analysis (ANOVA), followed by Tukey's post-test for group comparison using GraphPad PRISM 6.0 software (GraphPad, EUA). Statistical significance was represented as *** for p < 0.01.

3. RESULTS AND DISCUSSION

Nanostructure lipid carriers containing finasteride were developed to obtain a better delivery drug system for topical administration, aiming the improvement of the vehicle. To this end, we choose to use naturally balanced lipid composition of seed butters as solid core, stabilized by copolymer.



length carbon chain of the fatty acids that compose the material influence it. Thus, the less unsaturation and longer the chain, the higher the melting point (RUSTAN; DREVON, 2005). In our material, the composition of fatty acids makes it with high melting point and it is presented in the solid phase at room temperature (Table 1).

Table 1 - Percentage of fatty acids in *Passiflora incarnata* seed butter

Peak	Fatty Acid	RT Min	Area
1	C8:0	3.13	0.7
2	C10:0	5.26	0.9
3	C12:0	7.44	12.2
4	C14:0	9.47	4.9
5	C16:0	11.38	13.6
6	C16:1	11.57	0.3
7	C18:0	13.14	15.8
8	C18:1	13.28	38.7
9	C18:2	13.64	10.6
10	C18:3	14.15	0.2
11	C20:0	14.72	0.3
	Others		1.7

Legend: RT (min) = retention time in minutes; Area is related to the area of the peak obtained by GC.

3.2. Nanoparticles characterization

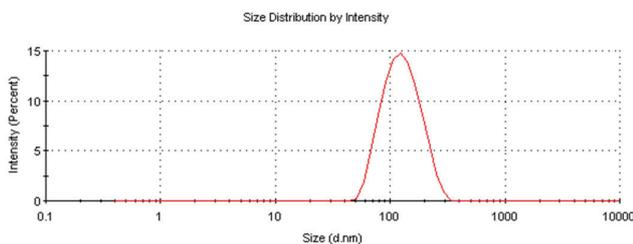


Figure 2 - Size distribution by intensity of NLC loaded with finasteride.

For NLC characterization, the size of particles and surface charge were measured and the results showed that nanoparticles loaded with finasteride

has hydrodynamic diameter and polydispersity index of 119.56 ± 1.07 nm and 0.186 ± 0.02 respectively (Figure 2). According to Feng, the size obtained fits a desirable range to reach the dermis and follicle. Values of polydispersity suggest that nanoparticles in

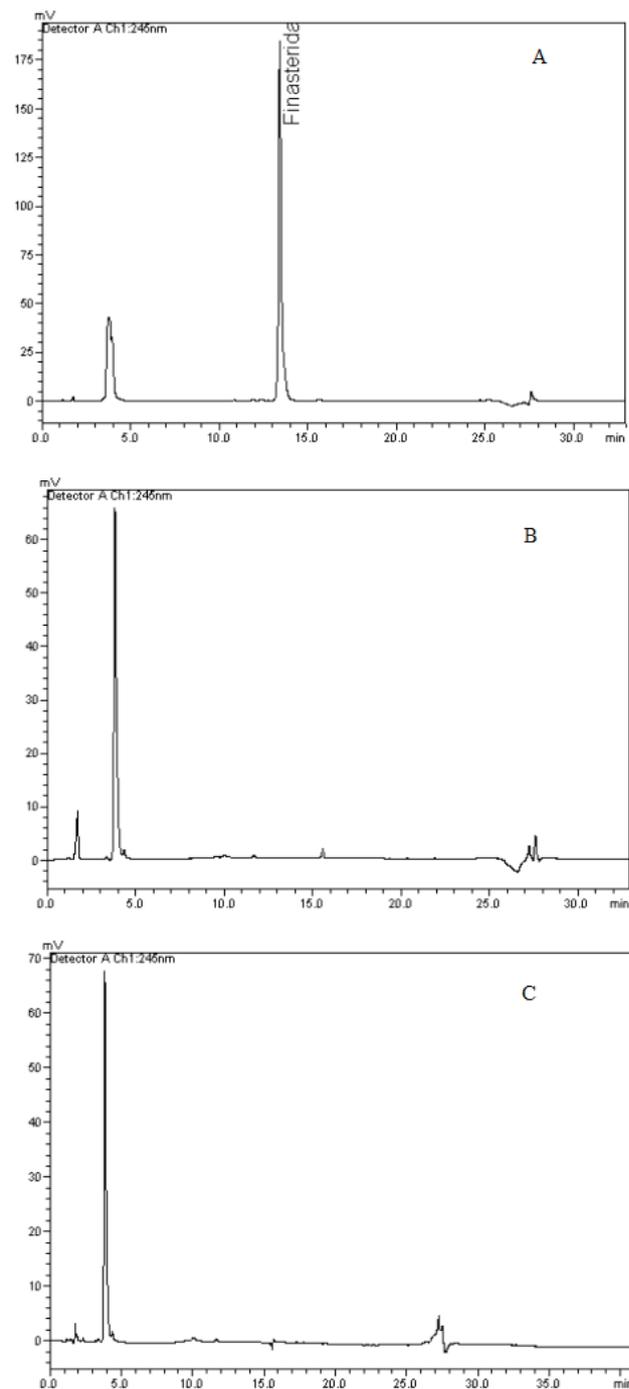


Figure 3 - Chromatograms of finasteride standard (A) and NLC at 15 days (B) and 45 days (C) of storage at 4°C.

the suspension are evenly distributed. After 30 days of storage, NLC presented hydrodynamic diameter of 132.7 nm and Pdl of 0.113, suggesting formulation stability. Negative Zeta potential values (-15.36 ± 2.34) was obtained, which is probably due to the presence of fatty acids organization in the nanoparticles. This result also imply that the formulation maybe stable by ionic repulsion in addition to the steric effect of PEG in the surface of the NLC.

3.3. Encapsulation Efficiency (EE)

Encapsulation efficiency was evaluated 15 and 45 days after NLC preparation. No free finasteride was detected in the samples (Figure 3). This result suggests that the drug was incorporated into the NLC and there was no leakage during the storage period at 4°C. In addition, the nanoparticles remained stable for the whole period, as there was no change in size or Pdl (data not shown).

Tripathi et al also developed stable lipid nanoparticles with drug content loss less than 1% after 120 days of storage. Another study demonstrated that there was no changes in terms of size and encapsulation efficiency after one month of storage (GRAVERINI et al., 2018). Gonçalves et al observed, as in consonancy with these priors studys, stability among parameters like entrapment efficiency, size and polydispersity after one-month storage at 5 ± 3 °C.

3.4. Cellular viability

The NLC containing finasteride did not present cytotoxicity against fibroblasts and keratinocytes (Figure 4). Analyzing the results from L929 cells, no statistical difference was found when comparing the treatment with NLC containing finasteride and free finasteride and other controls, at several concentrations. When analyzing the results of the treatment in keratinocytes (HaCat cells) we could observe no difference in cell viability comparing NLC

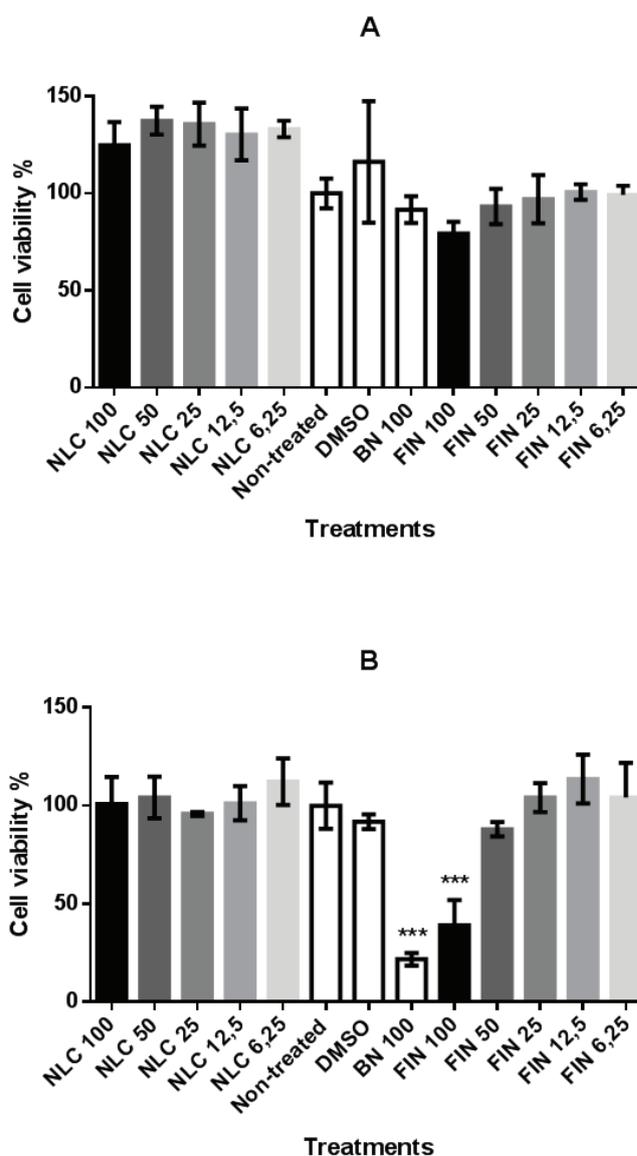


Figure 4- Cellular viability of fibroblasts (A) and keratinocytes (B), after the treatment with NLC and the controls. NLC: nanostructured lipid carrier containing finasteride; BN: blank nanoparticle; FIN: free finasteride. Numbers indicate the concentration in $\mu\text{g/mL}$ for each treatment. Data is presented as mean \pm SD (***) $p < 0,01$.

filled with drug and the non-treated cells. It's possible to note too that free finasteride with the highest concentration is toxic and this toxicity diminishes as the concentration get lower. This strongly suggests that the new formulation maybe safe for topical use in the AGA.



4. CONCLUSIONS

This study showed that nanostructured lipid carriers filled with finasteride were successfully prepared with natural lipids, presented high encapsulation efficiency, stability upon storage and negligible cytotoxicity. Their size is adequate for biomedical application, considering the topical administration route and delivery to hair follicles. Further analysis are necessary to ensure if this formulation can reach and stay in optimal concentration on the dermis, towards controlled release of finasteride. Overall, the NLC containing finasteride are promising delivery systems for the treatment of androgenetic alopecia.

5. REFERENCES

- BARUA, S.; MITRAGOTRI, S. Challenges associated with penetration of nanoparticles across cell and tissue barriers: A review of current status and future prospects. *Nano Today*. 9(2): 223–43, 2014.
- BATTAGLIA, L.; GALLARATE, M. Lipid nanoparticles: state of the art, new preparation methods and challenges in drug delivery. *Expert Opin Drug Deliv [Internet]*. 9(5): 497–508, 2012.
- CAON, T.; PORTO, L.C.; GRANADA, A.; TAGLIARI, M.P.; SILVA, M.A.S.; SIMÕES, C.M.O.; BORSALI, R.; SOLDI, V. Chitosan-decorated polystyrene-b-poly(acrylic acid) polymersomes as novel carriers for topical delivery of finasteride. *Eur J Pharm Sci*. 52(1): 165–172, 2014.
- DETONI, C.B.; SOUTO, G.D.; DA SILVA, A.L.M.; POHLMANN, A.R.; GUTERRES, S.S. Photostability and skin penetration of different E-resveratrol-loaded supramolecular structures. *Photochem Photobiol*. 88(4): 913–21, 2012.
- FENG, S.S. Nanoparticles of biodegradable polymers for new-concept chemotherapy. *Expert Rev Med Devices*. 1(1): 115–25, 2004.
- GOMES, M.J.; MARTINS, S.; FERREIRA, D.; SEGUNDO, M.A.; REIS, S. Lipid nanoparticles for topical and transdermal application for alopecia treatment: Development, physicochemical characterization, and *in vitro* release and penetration studies. *Int J Nanomedicine*. 9(1): 1231–1242, 2014.
- GONÇALVES, L.M.D.; MAESTRELLI, F.; MANNELLI, L.C.; GHELARDINI, C.; ALMEIDA, A.J.; MURA, P. Development of solid lipid nanoparticles as carriers for improving oral bioavailability of glibenclamide. *Eur J Pharm Biopharm.* 102(16): 41-50, 2016.
- GRAVERINI, G.; PIAZZINI, V.; LANDUCCI, E.; PANTANO, D.; NARDIELLO, P.; CASAMENTI, F.; PELLEGRINI-GIAMPIETRO, D. E.; BILIA, A.R.; BERGONZI, M.C. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces Solid lipid nanoparticles for delivery of andrographolide across the blood-brain barrier: *in vitro* and *in vivo* evaluation. *Colloids Surfaces B Biointerfaces.* 161: 302-313, 2018.
- HAMISHEKHAR, H.; GHANBARZADEH, S.; SEPEHRAN, S.; JAVADZADEH, Y.; ADIB Z.M.; KOUHSOLTANI, M. Histological assessment of follicular delivery of flutamide by solid lipid nanoparticles: Potential tool for the treatment of androgenic alopecia. *Drug Dev Ind Pharm.* 42(6): 846-853, 2016.
- JI, J.; HO, B.S.Y.; QIAN, G.; XIE, X.M.; BIGLIARDI, P.L.; BIGLIARDI-QI, M.; Aging in hair follicle stem cells and niche microenvironment. *J Dermatol.* 44(10): 1097-1104, 2017.
- KAUL, S.; GULATI, N.; VERMA, D.; MUKHERJEE, S.; NAGAICH, U. Role of Nanotechnology in Cosmeceuticals: A Review of Recent Advances. *J Pharm.* 2018: 1-19, 2018.
- LOLLI, F.; PALLOTTI, F.; ROSSI, A.; FORTUNA, M.C.; CARO, G.; LENZI, A.; SANSONE, A.; LOMBARDO, F. Androgenetic alopecia: a review. *Endocrine.* 57(1): 9-17, 2017.
- MADHESWARAN, T.; BASKARAN, R.; THAPA, R.K.; RHYU, J.Y.; CHOI, H.Y.; KIM, J.O.; YONG, C.S.; YOO, B. K. Design and *In Vitro* Evaluation of Finasteride-Loaded Liquid Crystalline Nanoparticles for Topical Delivery. *AAPS PharmSciTech.* 14(1): 45-52, 2013.
- MADHESWARAN, T.; BASKARAN, R.; YONG, C.S.; YOO, B.K. Enhanced Topical Delivery of Finasteride Using Glyceryl Monooleate-Based Liquid Crystalline Nanoparticles Stabilized by Cremophor Surfactants. *AAPS PharmSciTech.* 15(1): 44-51, 2014.
- MATOS, B.N.; REIS, T.A.; GRATIERI, T.; GELFUSO, G.M. Chitosan nanoparticles for targeting and sustaining minoxidil sulphate delivery to hair follicles. *Int J Biol Macromol.* 75: 225-229, 2015.
- MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods.* 65(1–2): 55–63, 1983.
- NILFOROUSHZADEH, M.A.; ZARE, M.; ZARRINTAJ, P.; ALIZADEH, E.; TAGHIABADI, E.; HEIDARI-KHARAJI, M.; AMIRKHANI, M.A.; SAEB, M.R.; MOZAFARI, M. Engineering the niche for hair regeneration - A critical review.

Nanomedicine Nanotechnology, *Biol Med.*, 15(1): 70-85, 2019.

PEREIRA, M.N.; USHIROBIRA, C.Y.; CUNHA-FILHO, M.S.S.; GELFUSO, G.M.; GRATIERI, T. Nanotechnology advances for hair loss. *Ther Deliv.*, 9(8): 593-604, 2018.

PRICE, V.H. Treatment of hair loss. *N Engl J Med.*, 341: 964-973, 1999.

RAMEZANI, V.; HONARVAR, M.; SEYEDABADI, M.; KARIMOLLAH, A.; RANJBAR, A.M.; HASHEMI, M. Formulation and optimization of transfersome containing minoxidil and caffeine. *J Drug Deliv Sci Technol.*, 44: 129-135, 2018.

RUSTAN, A.C.; DREVON, C.A. Fatty Acids: Structures and Properties. *Encycl Life Sci.*, 1: 1-7, 2005.

SCOW, D. T.; NOLTE, R. S.; SHAUGHNESSY, A. F. Medical treatments for balding in men. *American Family Physician.*, 59(8): 2189-2194, 1999.

SOUTO, E. B.; NAYAK, A. P.; MURTHY, R. S. R. Lipid nanoemulsions for anti-cancer drug therapy. *Pharmazie.*, 66(7): 473-478, 2011.

TRIPATHI, P.; KUMAR, A.; KUMAR, P.; RAM, J. Carbomer gel bearing methotrexate loaded lipid nanocontainers shows improved topical delivery intended for effective management of psoriasis. *Int J Biol Macromol.*, 120: 1322-1334, 2018.

Acknowledgments and institutional funding

We would like to thank to "Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior" (CAPES, Brazil) for funding with scholarship.

Conflicts of Interest

None to declare

Avaliação da qualidade físico-química e microbiológica de cápsulas de ômega-3 comercializadas no município de Nova Serrana - MG

Evaluation of quality physical chemistry and microbiological of Omega-3 capsules sold on the city of Nova Serrana – MG

SILVA, R. A.¹; SOUZA JUNIOR, E. A.¹; LOPES, L. H. C.¹; PEDROSA, D. O.¹; SILVA, K. O.¹; CORTEZ, E. N.¹; BRAZ, S. R.²; AMARO, S. H.¹; BRAZ, W. R.^{1*}

¹Centro Universitário Una de Bom Despacho, Bom Despacho/MG, Brasil;

²Instituto Federal do Triângulo Mineiro, Uberaba/MG, Brasil.

***Autor correspondente:** Wilson Rodrigues Braz

Centro Universitário Una de Bom Despacho, Rodovia BR-262, Km 480, s/ n - Zona Rural, Bom Despacho/MG/Brasil, CEP 35600-000.

Telefone: (37) 3516-1200. E-mail: wilsonbraz@prof.una.br

DOI: <https://doi.org/10.29327/226760.2.1-4>

Resumo

A ingestão de ω -3 como suplemento alimentar traz benefícios a saúde como prevenção de doenças cardiovasculares, supressão da resposta inflamatória e desenvolvimento neural. Os principais ativos responsáveis por esses efeitos são os ácidos eicosapentaenóico (EPA) e o docosaexaenóico (DHA). Devido ao aumento do consumo e fácil aquisição destes suplementos faz-se necessário o seu controle de qualidade para a segurança à saúde do consumidor. Objetivo: Avaliação dos parâmetros físico-químicos e microbiológicos de cápsulas de ômega-3 comercializadas na cidade de Nova Serrana-MG. Metodologia: Foram amostradas quatro marcas comercializadas nas drogarias da região central da cidade de Nova Serrana-MG, e realizadas de acordo com a Farmacopeia Brasileira 5ª edição os testes para peso médio, desintegração, teor de cinzas sulfatadas, índice de acidez, determinação do índice de peróxidos, análise de perfil lipídico, contagem total de microrganismos aeróbios mesófilos e pesquisa de *E. coli*, *S. aureus*, *Salmonella sp* e coliformes totais. Resultados: 100% das amostras satisfazem os requisitos microbiológicos. Nos testes físico-químicos 50% (A e D) das amostras apresentaram índice de peróxidos superiores aos limites determinados. Para perfil lipídico as amostras B e D obtiveram valores divergentes quanto ao valor rotulado para ALA (alfa-linoleico), EPA e DHA. Conclusão: Os desvios de qualidade apresentados apontam para a necessidade do cumprimento das Boas Práticas de fabricação descritas pela RDC nº 17 de 2010 e adequação das empresas ao controle sanitário de suplementos alimentares previstos na RDC nº 243 de 2018.

Palavras-chaves: Ômega-3; Controle de Qualidade; Cápsulas.

Abstract

The diet of ω -3 as food supply bring benefic to heath like prevent heart disease, suppression of inflammation and developmental neurology. The principal actives for that's effects is the fatty acid eicosapentaenoic (EPA) and docosahexaenoic (DHA). Because the growth of consumption and the easely acess of food supply turn the quality control is necessary to protect consumer health. Objectives: Evaluating the physical chemical and microbiology parameters of the omega-3 fatty acids sold in downtown Nova Serrana-Mg. Methods: Four brands were sampled in drugstores in the central region of the city of Nova Serrana-MG., and carried in according with Brazilian pharmacopoeia 5ªEd14, the tests were medium weight, disintegration, sulfated ashes, acidity test, peroxide value, lipid profile, counting aerobic mesophilic microorganisms and search for *E. coli*, *S. aureus*, *Salmonella* and total coliforms. Results: 100% of samples microbiology test is approved. At the test of physical chemical 50% (A and D) of samples shows result on peroxide value above limits determined. At the test lipid profile, 50% the samples (B and D) shows result of ALA (linoleic acid), EPA and DHA different from values present on your label. Conclusion: The variance of quality control shown necessity of legislation enforcement good pharmaceutical manufacturing practices provided RDC 17 of 2010, and adequacy from the companies to sanitary control of food supply provided on RDC 243 of 2018, to ensure quality and safety of product to the consumer.

Keywords: Omega-3; Quality Control; Capsules.



1. INTRODUCTION

Os ácidos graxos poli-insaturados (AGPI) são formados por cadeias de hidrocarbonetos com mais de uma insaturação e presença do grupamento funcional ácido carboxílico (-COOH), sendo de cadeia longa os que possuem acima de 18 átomos de carbono em sua molécula (GOMES et al., 2016).

Dentre os AGPI destacam-se a família ômega-3 (ω -3), assim denominados pelo fato de sua primeira insaturação ocorrer no terceiro carbono da cadeia de hidrocarbonetos. São considerados essenciais por serem obtidos exclusivamente através da alimentação não podendo ser sintetizados endogenamente. Suas principais fontes são peixes de águas frias como salmão e sardinha, óleos vegetais, sementes de linhaça e alguns legumes (NASCIUTTI et al., 2015).

A série ω -3 é constituída pelos ácidos alfa-linoleico (ALA), ácido eicosapentaenoico (EPA) e ácido docosaenoico (DHA) representados pela Figura-1. Quando ingerido, uma pequena quantidade do ALA é metabolizado pelo organismo em EPA, que possui uma cadeia de vinte átomos carbono, com cinco instaurações, já o DHA é derivado do próprio EPA sendo dotado de uma cadeia com vinte e dois carbonos e seis instaurações (DIAS; ALVES, 2013).



Figura 1: Moléculas de ácidos graxos.

Fonte: Curi et al., 2001 (Adaptada).

No Brasil, os ácidos graxos ω -3 são registrados junto ao Ministério da Saúde como suplementos alimentares e frequentemente são comercializados em formulações

farmacêuticas como cápsulas moles. Estes devem atender aos requisitos sanitários especificados na RDC nº 243, de 26 de julho de 2018, estando os mesmos em concordância com as exigências de identidade, pureza e composição descritas pela Farmacopeia Brasileira ou outro compêndio referido na mesma resolução (BRASIL, 2018a).

O consumo de suplementos alimentares como coadjuvantes na busca por manutenção ou melhorias de estado de saúde vem se difundindo exponencialmente. O uso diário de cápsulas de ω -3 traz diversos benefícios ao fisiológico humano, como prevenção de doenças cardiovasculares, desenvolvimento neural e supressão do desenvolvimento tumoral mamário estrógeno-dependente (MANNA et al., 2007; BRASIL, 2014; VAZ et al., 2014).

Raposo (2010) e Araya et al. (2004) concluíram em vossos estudos que o uso contínuo de ω -3 é capaz de alterar positivamente o perfil lipídico humano, aumentando as frações da lipoproteína de alta densidade (HDL) bem como reduzindo as lipoproteínas de baixa densidade (LDL), sendo uma responsável pelo transporte reverso do colesterol ao fígado e a outra principal geradora de placas ateroscleróticas respectivamente.

Os ácidos graxos EPA e DHA foram capazes de suprimir respostas inflamatórias e cessar estímulos causadores da dor induzida em ratos. Esses resultados são atribuídos à redução da produção de proteínas inflamatórias como as prostaglandinas E2 (PGE2), tromboxano A2 (TXA2), prostaciclina (PGI2) e leucotrieno B4. Sendo assim, a família ω -3 possui um mecanismo de ação similar a anti-inflamatórios não esteroides (AINES) como Tenoxicam, sugerindo que o uso prolongado seja benéfico em doenças inflamatórias crônicas principalmente em pacientes com complicações renais (SIMOPOULOS, 2002; KIECOLT-GLASER et al., 2011; MESQUITA et al., 2011).



Expostos os diversos benefícios comprovados da ingestão de ω -3, associados ao aumento do consumo deste suplemento, as indústrias farmacêuticas e órgãos fiscalizadores devem assegurar a qualidade destes produtos integralmente, seguindo os parâmetros descritos na RDC nº 17, de 16 de abril de 2010, pois qualquer desvio dos padrões desde a fabricação até acondicionamento e comercialização podem acarretar riscos à saúde do consumidor (BRASIL, 2010a).

Contudo, justifica-se a realização deste trabalho pelo crescimento do comércio de ω -3, baixo índice de estudos específicos sobre o tema proposto ainda que tenha estes uma legislação específica e a necessidade de uma maior vigilância das autoridades a respeito da qualidade destes suplementos (BRASIL, 2010a; BRASIL, 2018a).

Assim traçando um paralelo entre impacto positivo do consumo diário de cápsulas de ω -3 e a importância de um processo produtivo em acordo com as normas sanitárias, este trabalho visa possui como objetivo avaliar os parâmetros físico-químicos e microbiológicos de cápsulas de ômega-3 comercializados no município de Nova Serrana/MG.

METODOLOGIA

Realizou-se uma pesquisa experimental, em amostras de cápsulas moles de ω -3 comercializadas, na cidade de Nova Serrana-MG, região Centro Oeste de Minas Gerais. A escolha da cidade baseou-se em dados do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE), tomando como base o crescimento estimado da população das cidades do centro-oeste de Minas Gerais, em que, Nova Serrana foi o município na região que obteve o maior índice de crescimento estimado (35.4%) no período de 2010 a 2018, passando de 73.699 para 99.770 habitantes (BRASIL, 2018b).

Todos os reagentes utilizados apresentavam grau analítico adequado à técnica empregada, e as vidrarias

e equipamentos devidamente calibrados. Os meios de cultura foram preparados, esterilizados e armazenados conforme as orientações do fabricante e as boas práticas de laboratório (BPL).

Amostras

Para definição das marcas a serem pesquisadas foi realizada uma coleta de dados referente ao histórico de vendas nos últimos seis meses nas farmácias e drogarias da região central da cidade de Nova Serrana-MG, sendo essa escolhida por possuir maior número de estabelecimentos farmacêuticos (drogarias e farmácias) em relação aos bairros periféricos da cidade, bem como, maior fluxo de pessoas. Assim, um critério de exclusão a localização desses estabelecimentos localizados nos bairros. A região escolhida possui um total de 11 estabelecimentos no qual 6 (54,55%) aceitaram colaborar e partilhar as informações do histórico de vendas no primeiro semestre do ano de 2018.

De posse dos dados, observou-se que 14 marcas são comercializadas por estes estabelecimentos e para a definição analítica realizou-se um sorteio selecionando 4 amostras classificando-as como A, B, C e D, garantindo assim a imparcialidade na escolha das marcas, bem como a integridade dos estabelecimentos que as comercializam e seus fabricantes. As amostras foram adquiridas e mantidas em sua embalagem original e sob condições de armazenamento recomendadas pelos fabricantes.

Determinação de peso médio

A determinação do peso médio foi realizada conforme recomendação descrita pela Farmacopeia Brasileira 5ª edição (BRASIL, 2010b). Para tal foram pesadas individualmente 20 cápsulas de cada marca (A, B, C e D) utilizando a balança analítica Shimadzu®- ATY224 e os valores obtidos anotados sequencialmente em uma planilha no programa Microsoft Excel®2010. As cápsulas

foram então cortadas na posição central, lavadas com éter etílico P.A e postas para secar de acordo com sua numeração. Após o processo de secagem os invólucros vazios foram pesados individualmente e os valores anotados. O peso individual do conteúdo foi obtido pela diferença entre a cápsula cheia pela cápsula vazia e posteriormente calculado a média e desvio padrão (BRASIL, 2010b).

Como especificado pela Farmacopeia Brasileira 5ª edição, para cápsulas moles com peso médio superior a 300 mg, tolera-se uma variação individual de $\pm 7,5\%$ em relação à média de peso das 20 unidades. Se aceita ainda duas unidades fora do limite especificado em relação ao peso médio do conteúdo, desde que nenhuma obtenha valores abaixo ou acima do dobro da porcentagem limite de variação. Para desvio padrão o limite é de 4% e coeficiente de variação é de 1 (BRASIL, 2010b).

Teste de desintegração

O tempo de desintegração das cápsulas foi verificado conforme preconizado pela Farmacopeia Brasileira 5ª edição (BRASIL, 2010b). Foram analisadas 6 cápsulas de cada amostra (A, B, C e D) no desintegrador Nova Ética® 301-1, utilizando como meio de desintegração água purificada em temperatura de 37°C.

De acordo com a Farmacopeia Brasileira 5ª edição, ao fim de 30 minutos todas as cápsulas devem estar totalmente desintegradas, sem a presença de núcleo palpável (BRASIL, 2010b).

Determinação de cinzas sulfatadas

A metodologia utilizada para a determinação do teor de cinzas sulfatadas foi realizada conforme descrito da Farmacopeia Brasileira 5ª edição (BRASIL, 2010b). O teste é utilizado para determinar o teor de compostos inorgânicos presentes na amostra, sugerindo assim, possíveis impurezas.

Para a realização deste foram dessecados quatro cadinhos de porcelanas em estufa a 110 °C por duas horas sendo retirados em seguida e postos para resfriar em dessecador com sílica. Estes foram pesados individualmente e seus valores anotados e chamados de Peso do cadinho vazio (P1).

Para extração do óleo das cápsulas foram usadas seringas estéreis de 5mL. Foram pesadas utilizando a balança analítica Shimadzu®- ATY224, cerca de 2g de óleo para cada amostra no respectivo cadinho recebendo a denominação de Peso inicial (P3). Em capela de segurança química marca Quimis®, foi adicionado em cada amostra 1mL de ácido sulfúrico P.A; sendo posteriormente calcinados em mufla Quimis® Q318M a 600 °C por cinco horas até obtenção de peso constante da amostra, assim obtendo posteriormente o peso de cadinho com cinzas (P2).

A determinação do percentual de cinzas sulfatadas seguiu-se como descrito pela equação:

$$\text{Cinzas sulfatadas (\%)} = \frac{(P2-P1)}{P3} * 100$$

P1 - Peso do cadinho vazio; **P2** - Peso líquido das cinzas e **P3** - Peso de óleo ômega 3.

De acordo com Tonelotto et al., (2010) o teor de cinzas em peixes e alimentos marinhos devem estar entre 1,3% a 3,9%, garantindo uma quantidade de minerais adequada no mesmo. No caso das marcas de ω -3 avaliadas, os compostos são extratos oleosos de peixes sem a presença significativa de outros aditivos, assim valores acima de 1,3% indicam a presença de contaminantes inorgânicos na amostra como chumbo, mercúrio e sódio.

Índice de acidez

A metodologia utilizada para a determinação do índice de acidez (I_A) foi realizada como descrito pela Farmacopeia Brasileira 5ª edição tendo o intuito de observar se os óleos presentes nas amostras estão

em processo de hidrólise degradativa, o qual pode ser catalisado por atividades bacterianas, presença de impurezas e/ou armazenamento inadequado com exposição à luz ou calor (BRASIL, 2010b).

Para a realização do teste foram pesadas em balança analítica Shimadzu®- ATY224 10g do óleo extraído com seringas estéreis 5 ml, sendo vertidos em Erlenmeyer com capacidade para 250 mL. Foram adicionados 50 mL de uma mistura de etanol 96% e éter etílico P.A (1:1 - v/v) mantendo-se em aquecimento e agitação para dissolução da amostra, sendo titulado subsequentemente com hidróxido de potássio (KOH) 0,1 mol.L-1 (M) na presença do revelador fenolftaleína até a persistência superior a 15 segundos da cor rosa claro característica do ponto de viragem. Foi realizado ensaio em branco para correção do volume do titulante consumido (BRASIL, 2010b).

O resultado foi calculado como descrito pela Farmacopeia Brasileira 5ª edição através da equação:

$$I_A = \frac{5,610 * n (\text{volume titulante gasto})}{m (\text{massa amostra em g})}$$

I_A - índice de acidez

A conversão do índice de acidez para porcentagem deu-se como descrito por Bellaver; Zanotto (2004) onde, 1mg de KOH/g equivale a 0,503% de ácidos graxos, tendo como referência para avaliação dos resultados o limite de 2,5% definidos pelo mesmo para índice de acidez em óleos.

Determinação do índice de peróxidos

O índice de peróxidos (IP) foi realizado em parceria com uma indústria de alimentos cujo nome será preservado, de acordo com o método descrito pela American Oil Chemists' Society (AOCS) (AOCS, 1990).

Foram pesadas cerca de 2g de amostra e transferidas para Erlenmeyer. Adicionou-se 50 mL da solução

de ácido acético-isooctano (3:2) para dissolução da amostra. Posteriormente foi adicionado 0,5mL de solução de iodeto saturado de potássio e aguardado um minuto. Verteu-se imediatamente 30 mL de água destilada e 0,5mL de goma de amido 1% (m/v), sendo titulado com tiosulfato de sódio 0,1 N até completo desaparecimento da cor azul. Também foi conduzida uma determinação em branco (AOCS, 1990).

Os resultados foram calculados de acordo com a equação:

$$I_p = \frac{N * (A - B) * 1000}{m (\text{massa amostra em g})}$$

I_p - índice de peróxidos; **A** - volume gasto de tiosulfato de sódio; **B** - volume de tiosulfato gasto na titulação do branco; **N** - Normalidade da solução de tiosulfato de sódio.

O índice de peróxidos indica o grau de oxidação no qual se encontra os óleos amostrados, levando-os a sofrer alterações de suas características organolépticas como cor, sabor, aroma e consistência. Resultados acima de 10meq/g ou mL como definidos pela RDC nº 270, de 22 de setembro de 2005 indicam processos oxi-degradativos multifatoriais principalmente por má conservação, exposição à luz, excesso de umidade e presença de metais catalisadores (BRASIL, 2005).

Perfil lipídico

A análise do perfil lipídico tem como objetivo identificar e quantificar os componentes graxos presentes na amostra, permitindo assim uma avaliação minuciosa das informações nutricionais rotuladas pelo fabricante em relação aos resultados encontrados no teste.

A realização do teste foi terceirizada ao Laboratório de Águas e Alimentos da Universidade Estadual de Maringá, sendo as amostras indexadas pelos correios. Por se tratar de um teste de alto custo apenas duas das quatro amostras puderam ser analisadas devido

à limitação financeira. O critério para inclusão das marcas (B e D) foi definido de acordo com o melhor e o pior caso nos resultados para índice de acidez, no qual se avalia a degradação multifatorial dos óleos poli-insaturados.

Os valores de referência descritos nos rótulos para as amostras escolhidas B e D encontram-se nas Tabelas 1 e 2 respectivamente.

Tabela 1 – Dados nutricionais rotulados para a amostra B

QUANTIDADE POR PORÇÃO (2 cápsulas)		% VD(*)
Valor energético	21 Kcal = 88,2J	1
Gorduras totais, das quais:	2,1g	4
Gorduras saturadas	0,4g	**
Gorduras monoinsaturadas	0,6g	**
Gorduras poli-insaturadas, das quais:	0,6g	**
EPA	400mg	**
DHA	200mg	**
Colesterol	10mg	**

VD: Valores diários com base em uma dieta de 2000 Kcal ou 8400 KJ, EPA: Ácido eicosapentaenoico; DHA: Ácido docosaenoico.

Fonte: Rótulo do fabricante.

Tabela 2 – Dados nutricionais rotulados para a amostra D

QUANTIDADE POR PORÇÃO (3 cápsulas)		% VD(*)
Valor energético	27 Kcal = 113J	1
Gorduras totais, das quais:	3,0g	5
Gorduras saturadas	0,5g	2
Gorduras trans	0g	**
Gorduras monoinsaturadas	0,5g	**
Gorduras poli-insaturadas, das quais:	1,3g	**
EPA	0,5g	**
DHA	0,4g	**
Vitamina E	10mg	**

VD: Valores diários com base em uma dieta de 2000 Kcal ou 8400 KJ, EPA: Ácido eicosapentaenoico; DHA: Ácido docosaenoico.

Fonte: Rótulo do fabricante.

Contagem total de microrganismos aeróbios mesófilos

Para a realização do teste de contagem total de microrganismos aeróbios mesófilos, seguiu-se a metodologia descrita pela Farmacopeia Brasileira 5ª edição (BRASIL, 2010b) e Pinto et al., (2000). Produtos não estéreis podem possuir uma carga microbiológica dentro dos limites aceitáveis, desde que estes não sejam patogênicos (PINTO et al., 2000; BRASIL, 2010b).

Utilizou-se técnicas assépticas durante todo o processo em capela de segurança biológica Quimis® Q216-11EX. As embalagens foram previamente sanitizadas com álcool 70% (p/p). Os óleos das amostras (A, B, C e D) foram extraídos diretamente das respectivas cápsulas com auxílio de seringas estéreis 10 mL (BRASIL, 2010 b).

Para inoculação das amostras, inicialmente realizou-se o preparo de diluições seriadas (10^{-1} , 10^{-2} e 10^{-3}), sendo pesadas 10 g de cada amostra para 90 mL de água peptonada + 2% de Tween, obtendo a diluição 10^{-1} . Posteriormente foi transferido 10 mL dessa para 90 mL de água peptonada obtendo a diluição 10^{-2} e finalmente 10 mL desta transferida para 90mL de água peptonada obtendo a diluição 10^{-3} (PINTO et al., 2000; BRASIL, 2010b).

A partir das diluições preparadas, foram inoculados em duplicata 1mL de cada diluição pelo método de semeadura por profundidade e posteriormente adicionadas às estas placas Ágar para contagem (PCA) e Ágar Sabouraud Dextrose (SBA), sendo homogeneizadas e solidificadas (FIGURA 2). As placas de PCA foram incubadas em estufas a $32,5^{\circ}\text{C} \pm 2,5^{\circ}\text{C}$ durante 3-5 dias para propiciar crescimento bacteriano, já as contendo SBA foram incubadas a $22,5^{\circ}\text{C} \pm 2,5^{\circ}\text{C}$ por 5-7 dias para propiciar crescimento fúngico. Foram preparadas placas com PCA e SBA sem inoculação de amostra como controle negativo (BRASIL, 2010 b).

De acordo com a Farmacopeia Brasileira 5ªedição

o limite de bactérias aeróbicas mesófilas para preparação de produtos de uso oral a base de matéria prima vegetal é de 103 UFC/g ou mL com ausência de *Escherichia coli*, *Salmonella sp.* e *Staphylococcus aureus* e é de 102 UFC/g ou mL para fungos (BRASIL, 2010 b).

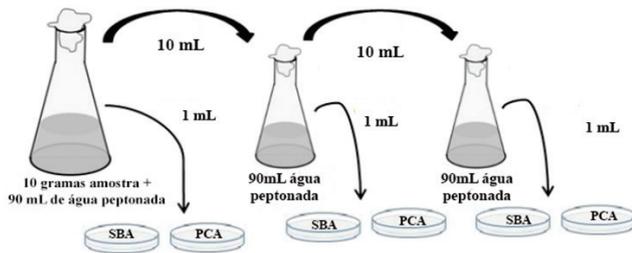


Figura 2: Metodologia para diluições e inoculação das amostras.

SBA- Agar Sabouraud, PCA – Ágar para contagem.

Fonte: Mendes et al., (2018) (adaptada).

Pesquisa de microrganismos patogênicos

Para as amostras (A, B, C e D) foram realizadas pesquisa dos microrganismos patogênicos *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Salmonella sp* e coliformes totais. Foram inoculados 0,1 mL das amostras diretamente em meios seletivos com auxílio da alça de Drigalski, sendo Ágar Salmonella-Shigela (SS) para pesquisa de *Salmonella sp*, Ágar MacConkey (MC), para pesquisa de *Escherichia coli*, Agar Sal Manitol (MS) para pesquisa de *Staphylococcus aureus*. Incubaram-se as placas de meios seletivos a 32,5 +2,5°C por 48 horas (BRASIL, 2010b).

Para a pesquisa de coliformes 1 mL das amostras foram inoculadas em 9 mL de Caldo Verde Bile Brillhante (VBBL) + 2% de Tween com tubos de Durham invertidos, sendo observado o crescimento por turvação e/ou produção de bolhas (BRASIL, 2010b).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Peso médio

Os resultados obtidos para o teste de peso médio estão descritos na Tabela-3, bem como desvio padrão e coeficiente de variação.

Tabela 3 - Valores obtidos no teste de determinação de peso médio

Amostras	A	B	C	D
Peso Médio(g)	0,998	0,982	0,979	0,982
DP	0,001446	0,007662	0,005165	0,009165
CV	0,144	0,779	0,527	0,933

DP: Desvio Padrão; CV: Coeficiente Variação (%).

Os resultados individuais para massas de conteúdos obtidas para cada cápsula das amostras (A, B, C e D) em relação à média e as variações permitidas estão dispostos nas cartas de controle (Gráficos 1 a 4).

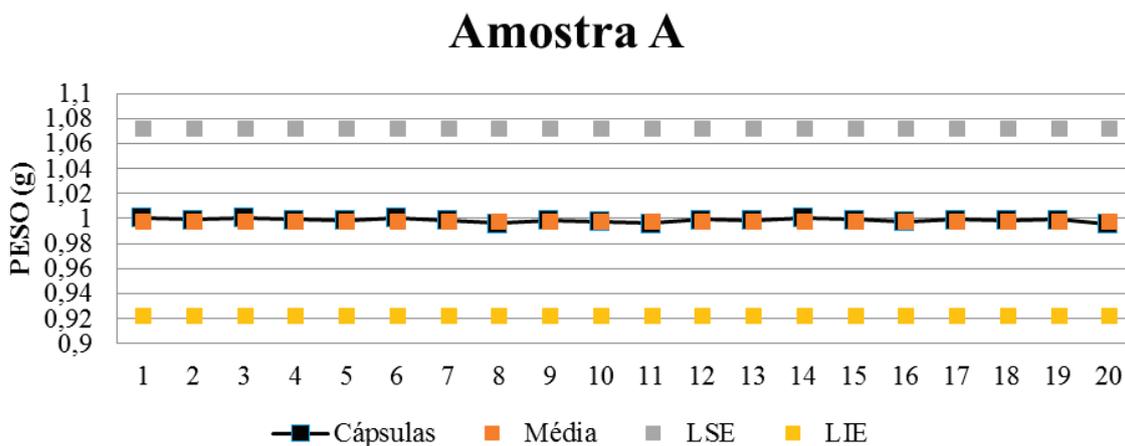
A análise dos dados obtidos na Tabela-3 e nos Gráficos de 1 a 4 permitem inferir que todas as formulações testadas foram aprovadas segundo os critérios estabelecidos pela Farmacopeia Brasileira 5ª edição (BRASIL, 2010b). A amostra D apresentou o maior coeficiente de variação (0,933%) e a amostra A o menor (0,144%) em relação ao valor médio, entretanto, nenhuma das amostras apresentou valor individual acima ou abaixo dos critérios de aceitação farmacopéicos.

Os resultados demonstram uma eficácia no controle dos processos produtivos das indústrias fabricantes das marcas avaliadas de acordo com as Boas Práticas Farmacêuticas referidas na RDC nº 17, de 16 de abril de 2010 (BRASIL, 2010a). Os resultados para todas as amostras (A, B, C e D), corroboram com os obtidos por Silva; Silva (2014) ao avaliar a qualidade de cápsulas manipuladas em farmácias magistrais de Mogi Guaçu-SP quanto a determinação de peso médio, onde os dois testes obtiveram 100% das amostras aprovadas. Já em relação ao desvio padrão os resultados abaixo de 4% (DP) para as quatro marcas de ω -3 levando a 100% de aprovação, foram superiores aos 80% obtidos em seu estudo.

A aprovação no teste também evidencia a garantia

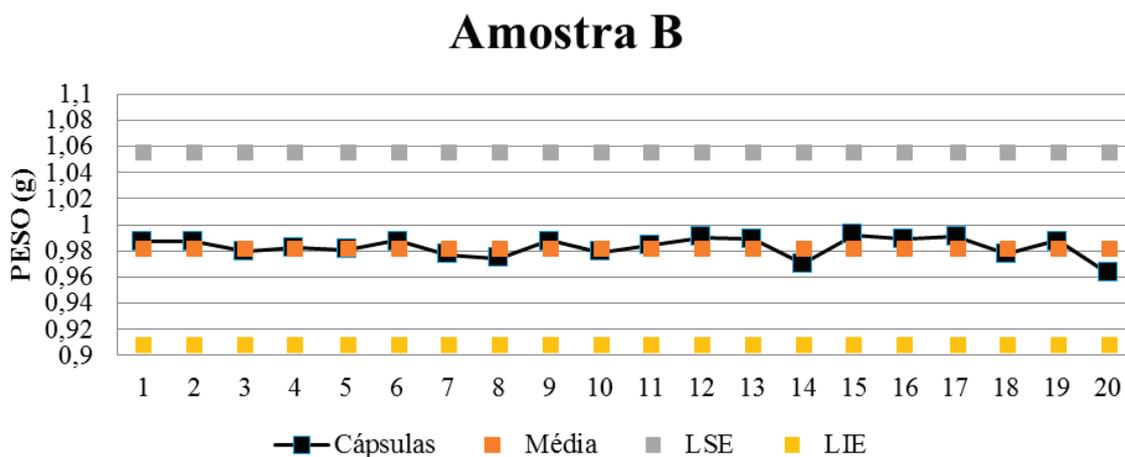


Gráfico 1 - Carta controle dos pesos individuais das cápsulas obtidos em comparação com a média de peso da amostra A.



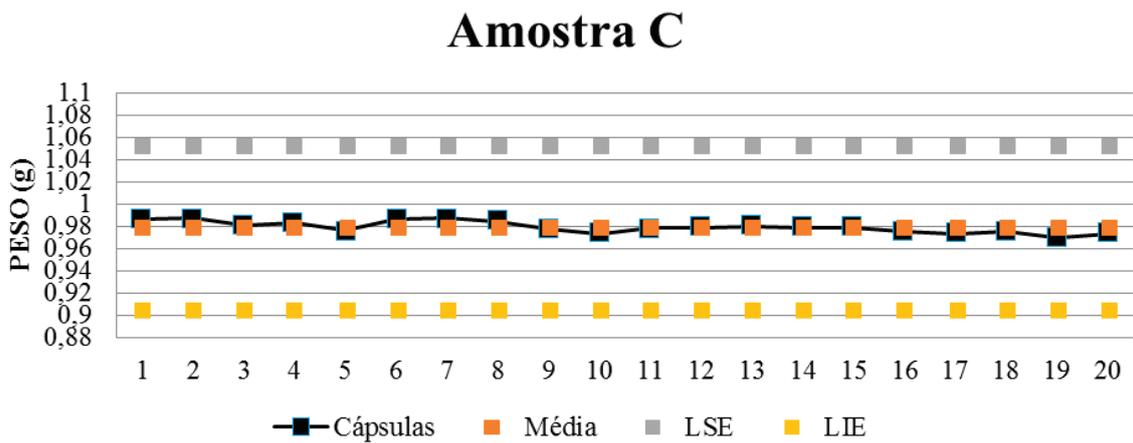
LSE: Limite Superior Estabelecido; **LIE:** Limite Inferior Estabelecido.

Gráfico 2 - Carta controle dos pesos individuais das cápsulas obtidos em comparação com a média de peso da amostra B.



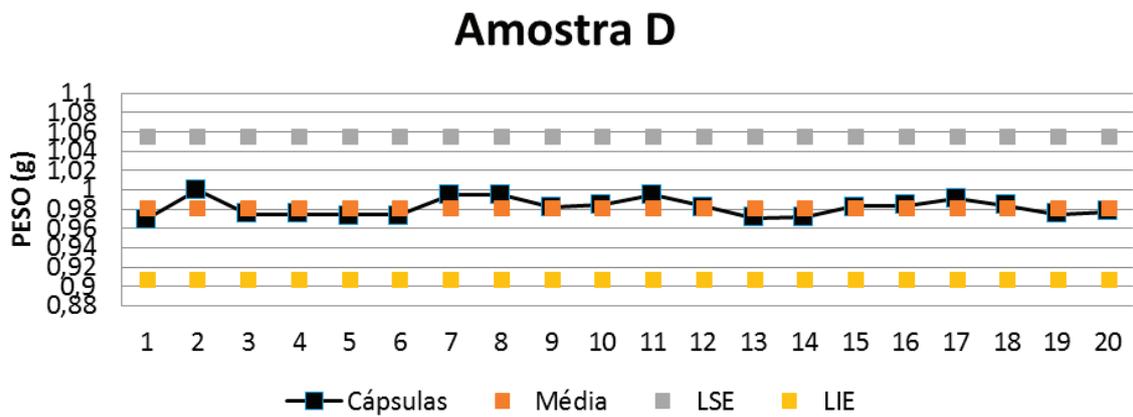
LSE: Limite Superior Estabelecido; **LIE:** Limite Inferior Estabelecido.

Gráfico 3 - Carta controle dos pesos individuais das cápsulas obtidos em comparação com a média de peso da amostra C.



LSE: Limite Superior Estabelecido; **LIE:** Limite Inferior Estabelecido.

Gráfico 4 - Carta controle dos pesos individuais das cápsulas obtidos em comparação com a média de peso da amostra D.



LSE: Limite Superior Estabelecido; **LIE:** Limite Inferior Estabelecido.

parcial de segurança terapêutica em relação ao conteúdo das cápsulas ressaltada por Simch (2013) em seus estudos, desde que o perfil lipídico atenda aos requisitos entre valor rotulado e real. De acordo com a mesma, valores inferiores aos padrões estabelecidos para conteúdo podem indicar baixa efetividade terapêutica, assim como valores acima da dose especificada podem aumentar os riscos de toxicidade.

Barros (2013) em seu estudo sobre controle de cápsulas de fluoxetina comercializado no município de João Pessoa-PB, obteve valores similares ao das marcas de ω -3 avaliadas, onde a autora ressalta a importância da avaliação do desvio padrão e coeficiente de variação para complementação dos dados obtidos no teste de peso médio, relacionando o desvio padrão à variação dos valores obtidos em relação à média geral. Assim quanto maior resultado do desvio padrão, menor a uniformidade do envase, bem como para coeficiente de variação os valores dados percentualmente refletem o desvio do conteúdo em relação à média de peso geral, apontando a variabilidade do processo produtivo, elucidando a importância da aprovação de todas as marcas no teste.

Teste de desintegração

Os tempos de desintegração obtidos para amostras (A, B, C e D) são apresentados na Tabela-4.

Tabela 4 - Valores para tempo de desintegração

Amostras	A	B	C	D
TD	7:49	8:27	9:37	14:59

TD: tempo de desintegração (minutos)

Pelos dados observou-se que todas as amostras (100%) cumprem a especificação determinadas pela Farmacopeia brasileira 5ª edição (BRASIL, 2010b) para o tempo de desintegração (inferior a 30 minutos). O resultado demonstra que o pior tempo de desintegração ocorreu para a amostra D, sendo em

média o dobro do tempo da amostra A que obteve o menor tempo de desintegração.

As desintegrações de 100% das amostras abaixo dos 30 minutos corroboram com as observações dos pesquisadores Mota; Soares (2012); Cruz (2017) que descrevem que a desintegração está estritamente interligada com a biodisponibilidade do fármaco.

Oliveira; Campos (2017) complementam o processo de desintegração como mediador da absorção, biodisponibilidade e efeitos terapêuticos do fármaco. Assim a aprovação de todas as marcas de ω -3 avaliadas como ocorrido em ambos os estudos evidenciam a qualidade das cápsulas e a disponibilidade da matéria graxa para posterior dissolução e absorção.

Determinação de cinzas sulfatadas

Os dados obtidos para o teor de cinzas sulfatadas estão descritos na Tabela-5.

Tabela 5 - Resultado do teste de determinação de cinzas sulfatadas.

Amostras	A	B	C	D
TC	0,0147	0,0349	0,0321	0,0148

TC: Teor de cinzas sulfatadas (% massa)

Os resultados demonstram um baixo percentual de cinzas sulfatadas para as amostras (A, B, C e D) possuindo massa inferior a 0,04%, em concordância com o limite de 1,3% definido através da adaptação dos teores descritos por Tonelotto et al. (2010) para peixes e alimentos de origem marinha.

O teste de cinzas sulfatadas é um determinador de matéria inorgânica presente na amostra. Assim, como 100% das amostras apresentaram baixo teor de cinzas sulfatadas há uma segurança quanto à contaminação por metais potencialmente tóxicos como chumbo e mercúrio (TONELOTTO et al., 2010). Esses dados corroboram ainda com Frizon et al., (2009), que obteve em média 0,011% de cinzas sulfatadas nos óleos testados em seu estudo.



Segundo Morgano et al (2011) existe a possibilidade da produção de biodiesel através de óleo de peixes, desde que o valor máximo de cinzas destes se limitassem a 0,02%. Segundo tal estudo, apenas as amostras A e D estariam aptas para a produção do biodiesel.

Índice de acidez

A Tabela-6 apresenta os resultados obtidos para o teste de índice de acidez (IA) para as amostras (A, B, C e D).

Tabela 6 - Resultado do teste de índice de acidez

Amostras	A	B	C	D
IA	0,4488	0,1122	0,2244	1,2342
%	0,22	0,056	0,113	0,62

IA: Índice de acidez (mg KOH/g).

O teste de índice de acidez obteve resultados satisfatórios baseado na recomendação de Bellaver; Zanotto (2004), onde 100% das amostras apresentaram índice de acidez abaixo de 2,5%. Os resultados inferem que as amostras A, B e C, apresentam menor degradação das cadeias de seus ácidos graxos poli-insaturados. A amostra B apresentou menor resultado e, portanto, a menor taxa de degradação. Já a amostra D apresentou um índice de acidez elevado em relação as demais amostras, em torno de 10 vezes o valor obtido em B, podendo indicar um estado de degradação superior em comparação as demais amostras.

Em contrapartida Bery et al., (2012) relatam que os valores de índice de acidez não poderiam ser superiores a 1mg de KOH/g em seu estudo sobre uso de óleos de vísceras de peixe para produção de biocombustível. Assim, as amostras A, B e C estariam dentro dos padrões estabelecidos pelo mesmo, já o resultado obtido na amostra D corrobora com os encontrados pelo autor em seus testes, estando fora do limite estabelecido.

Determinação do índice de peróxidos

Os resultados obtidos para a determinação do índice de peróxidos estão apresentados na Tabela-7.

Tabela 7 - Resultado do teste de índice de peróxidos

Amostras	A	B	C	D
IP	10,11	4,63	6,13	14,61

IP: Índice de peróxido em miliequivalentes de oxigênio (meq/Kg)

Os resultados demonstram que a amostra D apresenta maior índice de peróxidos portanto, uma degradação oxidativa maior que as demais amostras. Em contrapartida, a amostra B com menor resultado evidencia menor degradação oxidativa. Esses resultados corroboram com o índice de acidez onde a amostra D foi o pior caso e a B o melhor caso.

Em relação ao preconizado pela RDC nº 270, de 22 de setembro de 2005 (BRASIL, 2005), onde os valores de índice de peróxidos não podem ser superiores a 10 meq/kg. Assim as amostras A e D se encontram fora das especificações, já as amostras B e C, estão de acordo com o limite especificado.

Em comparação com estudo realizado por Vidotti; Gonçalves (2006) sobre óleo de tilápias em que obtiveram índice de peróxido de 6,8 meq/Kg, as amostras B, e C se assemelham ao mesmo. A amostra A obteve valor 48,67% superior ao obtido pelo mesmo e a amostra D apresentou resultado acima de 100% do encontrado em seu trabalho. Como descrito por Pacheco (2009), a oxidação gera instabilidade nas duplas ligações dos ácidos graxos poli-insaturados levando a processos degradativos.

Perfil lipídico

O teste de perfil lipídico foi realizado pelo Laboratório de Águas e Alimentos da Universidade Estadual de Maringá-PR. A análise foi terceirizada apenas para as marcas B e D, de acordo com o melhor e pior caso baseado no resultado obtido respectivamente, no teste índice de acidez. Os valores de perfil lipídicos descritos em relação a cada grama de amostra permitem uma análise precisa das informações fornecidas pelos fabricantes nos rótulos das embalagens.

Os valores encontrados para o perfil lipídico (mg/g e %) estão dispostos nas Tabelas-8 e 9 para amostra B e nas Tabelas-10 e 11 para amostra D.

O perfil lipídico das amostras revelou a presença de quatro ácidos graxos poli-insaturados da série ω -3, sendo eles o ácido di-homo- (a) linolênico, ALA, EPA e DHA. O EPA e DHA da amostra B juntos somam 152,75 mg/g o que indica um desvio de 34,44% em relação as informações nutricionais rotuladas que apontam presença de 285mg a cada grama consumida do

produto. Já para a amostra D, os mesmos obtiveram somados 135,75mg/g, correspondendo um desvio de 41,74% em comparação ao valor declarado de 233mg/g.

O perfil lipídico da amostra D corrobora com os resultados do índice de acidez e índice de peróxidos que demonstraram uma maior degradação dessa amostra. Porém não satisfaz os resultados para a amostra B, estando à mesma dentro das especificações definidas para ambos os testes.

Tabela 8 - Valores para o perfil lipídico da amostra B (mg/g)

Ácido Graxo		mg/g
14:0	Mirístico	11,59
15:0	Ácido Pentadecanóico	8,47
16:0	Palmítico	156,18
16:1n-7	Palmitoléico	3,89
16:1n-9	Ácido 7 - Hexadecanóico	54,22
17:0	Ácido Anteisomargárico	15,12
17:1n-9	Ácido 8 - Heptadecenóico	9,22
18:0	Estearico	37,85
18:1n-7	Vacênico	35,80
18:1n-9	Oléico	109,14
18:2n-6	Linoleico	15,21
18:3n-3	Alfa - Linolênico	3,22
18:3n-6	Gama - Linolênico	4,50
20:0	Araquídico	12,71
20:1n-9	Gondóico	41,07
20:5n-3(EPA)	Timnodônico	12,76
20:4n-6(AA)	Araquidônico	232,64
20:3n-3	Ácido di - homo - (a) linolênico	20,13
22:5n-6 (DPA)	-	5,25
22:6n-3(DHA)	Cervônico	136,99
24:0	Lignocérico	4,47
24:1n-9	Nervônico	25,65
TOTAL (EPA + ALA + DHA)		152,97

EPA: Ácido eicosapentaenoico; **ALA:** Ácido alpha-linoleico; **DHA:** Ácido docosaenoico

Tabela 9 - Valores para o perfil lipídico da amostra B (%)

Ácido Graxo		%
14:0	Mirístico	1,159
15:0	Ácido Pentadecanóico	0,847
16:0	Palmítico	15,618
16:1n-7	Palmitoléico	0,389
16:1n-9	Ácido 7 - Hexadecanóico	5,422
17:0	Ácido Anteismargárico	1,512
17:1n-9	Ácido 8 - Heptadecenóico	0,922
18:0	Esteárico	3,785
18:1n-7	Vacênico	3,580
18:1n-9	Oléico	10,914
18:2n-6	Linoleico	1,521
18:3n-3	Alfa - Linolênico	0,322
18:3n-6	Gama - Linolênico	0,450
20:0	Araquídico	1,271
20:1n-9	Gondóico	4,107
20:5n-3(EPA)	Timnodônico	1,276
20:4n-6(AA)	Araquidônico	23,264
20:3n-3	Ácido di - homo - (a) linolênico	2,013
22:5n-6 (DPA)	-	0,525
22:6n-3(DHA)	Cervônico	13,699
24:0	Lignocérico	0,447
24:1n-9	Nervônico	2,565
TOTAL (EPA + ALA + DHA)		15,347

EPA: Ácido eicosapentaenoico; **ALA:** Ácido alpha-linoleico; **DHA:** Ácido docosaenoico

Tabela 10 - Valores para o perfil lipídico da amostra D (mg/g)

Ácido Graxo		mg/g
14:0	Mirístico	11,72
15:0	Ácido Pentadecanóico	1,65
16:0	Palmítico	101,69
16:1n-7	Palmitoléico	2,13
16:1n-9	Ácido 7 – Hexadecanóico	35,57
17:0	Ácido Anteisomargárico	7,25
17:1n-9	Ácido 8 - Heptadecenóico	4,55
18:0	Estearico	50,38
18:1n-7	Vacênico	42,93
18:1n-9	Oléico	156,54
18:2n-6	Linoleico	23,53
18:3n-3	Alfa – Linolênico	3,36
18:3n-6	Gama – Linolênico	5,47
20:0	Araquídico	14,98
20:1n-9	Gondóico	38,20
20:5n-3(EPA)	Timnodônico	20,75
20:4n-6(AA)	Araquidônico	206,68
20:3n-3	Ácido di - homo - (a) linolênico	17,23
22:5n-6 (DPA)	-	4,88
22:6n-3(DHA)	Cervônico	115,28
24:0	Lignocérico	4,53
24:1n-9	Nervônico	15,47
TOTAL (EPA + ALA + DHA)		139,39

EPA: Ácido eicosapentaenoico; **ALA:** Ácido alpha-linoleico; **DHA:** Ácido docosaexaenoico

Tabela 11 - Valores para o perfil lipídico da amostra D (%)

Ácido Graxo		mg/g
14:0	Mirístico	10,172
15:0	Ácido Pentadecanóico	0,165
16:0	Palmítico	10,169
16:1n-7	Palmitoléico	0,213
16:1n-9	Ácido 7 - Hexadecanóico	3,557
17:0	Ácido Anteismargárico	0,725
17:1n-9	Ácido 8 - Heptadecenóico	0,455
18:0	Estearico	5,038
18:1n-7	Vacênico	4,293
18:1n-9	Oléico	15,654
18:2n-6	Linoleico	2,353
18:3n-3	Alfa - Linolênico	0,336
18:3n-6	Gama - Linolênico	0,547
20:0	Araquídico	1,498
20:1n-9	Gondóico	3,820
20:5n-3(EPA)	Timnodônico	2,075
20:4n-6(AA)	Araquidônico	20,668
20:3n-3	Ácido di - homo - (a) linolênico	1,723
22:5n-6 (DPA)	-	0,488
22:6n-3(DHA)	Cervônico	11,528
24:0	Lignocérico	0,453
24:1n-9	Nervônico	1,547
TOTAL (EPA + ALA + DHA)		13,939

EPA: Ácido eicosapentaenoico; **ALA:** Ácido alpha-linoleico; **DHA:** Ácido-docosaexaenoico.



Em comparação com a ingestão sugerida pelo fabricante de duas cápsulas diárias para a amostra B, de um total de 400 mg de EPA e 200 mg de DHA, o valor o real ingerido seria de 276 mg de EPA e 287 mg de DHA. O mesmo ocorre para a amostra D, onde se sugere o consumo de três cápsulas diariamente para ingestão total de 500 mg de EPA e 400 mg de DHA, sendo ingerido de acordo com os resultados 62,25 mg de EPA e 345 mg de DHA.

De acordo com as especificações impostas pela RDC nº 243, de 26 de julho de 2018 (BRASIL, 2018) que define como obrigatório a rotulagem da composição dos produtos, as marcas avaliadas se encontram irregulares.

Os resultados obtidos corroboram com Lima (2016), que em seu estudo sobre suplementos alimentares para emagrecimento demonstrou que as marcas avaliadas apresentaram quantidades de compostos como vitamina E, vitamina C e metabólitos secundários inferiores aos rotulados.

Segundo Santos et al., (2013) a ingestão de ω -3, apesar de ainda não ser completamente elucidada, pode trazer benefícios à saúde de portadores de dislipidemias e complicações cardíacas, principalmente aqueles ricos em EPA e DHA. Em relação à ingestão diária sugerida pelo fabricante, à quantidade de EPA obtida na amostra B, e DHA e EPA para amostra D serão inferiores as quantidades necessárias para suposta obtenção dos efeitos desejados.

Analisando amplamente o resultado, observa-se que as amostras obtiveram um valor total mais elevado de compostos da série ômega-6 (ω -6) e ômega-9 (ω -9) em relação ao próprio ω -3. Martin et al., (2006) em seu estudo relata que a ingestão elevada de ω -6 em relação ao ω -3 ocorre frequentemente na dieta ocidental e assim, diminui a conversão endógena do

ALA presente no suplemento em ácidos graxos poli-insaturados de cadeia longa como o EPA. Portanto, a presença superior da série ω -6 caracteriza-se como um desvio de qualidade, levando a diminuição dos efeitos esperados no consumo do produto.

Outra inconformidade a se destacar é o excesso de ácido graxo monoinsaturado apresentado no perfil lipídico, principalmente em se tratando de um suplemento intrinsecamente relacionado à busca auxiliar do controle de dislipidemias e outras doenças cardiovasculares, bem como a associação do consumo de gorduras saturadas a elevação do HDL plasmático e risco cardíaco descrito nas Diretrizes sobre Consumo de Gorduras e Saúde Cardiovascular. Os rótulos das marcas B e D descrevem a concentração presente de 190 mg/g e 166,6 mg/g respectivamente, enquanto a análise de perfil lipídico expõe resultado de 246,39 mg/g para a marca B e, 192,2 mg/g para amostra D.

Assim, as marcas apresentam irregularidades quanto à composição declarada frente ao valor nutricional real, evidenciando falhas durante a padronização do óleo e as exigências sanitárias recomendadas pelas RDC nº 243, de 26 de julho de 2018 e RDC nº 17, de 16 de abril de 2010 (BRASIL, 2010a; BRASIL, 2018) .

Contagem total de microrganismos mesófilos

Os resultados obtidos para contagem total de colônias de bactérias em ágar PCA são apresentados na Tabela 12 e se encontram dentro dos limites definidos pela Farmacopeia brasileira 5ª edição (BRASIL, 2010b) para preparações de uso oral de matéria prima animal, obtendo valores abaixo de 103 UFC/g ou mL. Para contagem de colônias fúngicas em ágar Sabouraud os dados são apresentados na Tabela 13 e o crescimento se manteve abaixo do limite 102 descritos pelo compêndio referencial em questão.

Molina et al., (2018) em seu estudo alerta para os agravos a saúde ocasionados pela ingestão de

Tabela 12 - Contagem de colônias ágar PCA

Amostras	Diluição 10-1	Diluição 10-2	Diluição 10-3
A	<10 ²	<10 ²	<10 ²
B	<10 ²	<10 ²	<10 ²
C	<10 ²	<10 ²	<10 ²
D	<10 ²	<10 ²	<10 ²
CN			0

CN: Controle negativo; **PCA:** Ágar para contagem.

Tabela 13 - Contagem de colônias ágar Sabouraud

Amostras	Diluição 10-1	Diluição 10-2	Diluição 10-3
A	<10 ¹	<10 ¹	<10 ¹
B	<10 ¹	<10 ¹	<10 ¹
C	<10 ¹	<10 ¹	<10 ¹
D	<10 ¹	<10 ¹	<10 ¹
CN			0

CN: Controle negativo

alimentos com contaminação microbiana, que vão de uma leve intoxicação alimentar com vômitos a casos mais graves podendo inclusive levar a óbito. Assim destaca-se relevância da contagem dentro dos parâmetros definidos pela Farmacopeia Brasileira 5^o edição.

Antunes et al., (2014) reforça em seu estudo que a contagem de microrganismos aeróbios mesófilos dentro dos parâmetros referencias evidenciam a produção dentro das qualificações descritas pelas Boas Práticas de Fabricação de Medicamentos na RDC nº 17, de 16 de abril de 2010 para prevenção de contaminação microbiológica.

O controle negativo realizado não obteve crescimento de colônias indicando a esterilidade do meio utilizado. Apesar da aprovação de todas as amostras para contagem total de bactérias, as marcas seguiram para a pesquisa de microrganismos patogênicos.

Pesquisa de microrganismos patogênicos

Os testes para avaliação da presença de microrganismos patogênicos foram realizados em ágar Salmonella-Shigela para identificação de colônias de *Salmonella sp.*, ágar MacConkey para *E. coli* e ágar Manitol Salgado para *Staphylococcus aureus* e são apresentados na Tabela 14.

Assim 100% das amostras avaliadas foram aprovadas de acordo com a especificação descrita pela Farmacopeia brasileira 5^o edição, que define a ausência desses como critério de qualificação das marcas testadas (BRASIL, 2010b).

De acordo com Teixeira; Garcia (2016) o pescado é um produto facilmente perecível, sujeito após *rigor mortis* à degradação rápida por microrganismo, devido à grande variedade de nutrientes presentes no mesmo. Entre os contaminantes mais comuns durante o

Tabela 14 - Pesquisa de microrganismos patogênicos

Amostras	Ágar Salmonella-Sigheila (SS)	Ágar MacConkey (MC)	Ágar Manitol Salgado
A	A	A	A
B	A	A	A
C	A	A	A
D	A	A	A
CN	A	A	A

CN: Controle negativo; **A:** Ausência de colônias.

processamento de peixes estão os patógenos, *Salmonella sp.* e *Staphylococcus aureus*. Assim, por ser neste estudo a matéria prima primordial para a produção dos produtos avaliados, torna ainda mais relevante à ausência desses microrganismos patogênicos.

Segundo Verdi et al., (2013) para avaliação da qualidade microbiológica de cápsulas obtidas de produtos com possível microbiota intrínseca, a ausência de microrganismos patogênicos evidencia um controle microbiológico durante o processo produtivo e assim manter Boas Práticas de Fabricação (BPFs) como previsto pela RDC nº 17, de 16 de abril de 2010.

A contaminação de produtos oleosos por bactérias pode elevar a degradação dos compostos graxos poli-insaturados evidenciados pelo teste de índice de acidez. Diante disso os resultados dos testes microbiológicos indicam a não relação entre contaminação por microrganismos e elevada degradação graxa da amostra D.

Pela ausência do crescimento de colônias nos testes específicos, não foram necessárias as realizações de provas bioquímicas.

Limitações do trabalho

O estudo realizado apresentou limitações quanto à indisponibilidade de equipamentos necessários para a realização de testes específicos para identificação de metais potencialmente tóxicos para a correlação com o teste de teor de cinzas. Também ficou limitada, devido ao seu alto custo, a possibilidade financeira de terceirizar o teste de perfil lipídico para todas as marcas. O trabalho se limitou a avaliar um lote de cada marca, assim considerando que os resultados correspondem apenas a estes, sugere-se o prosseguimento da pesquisa com maior número de amostras e/ou marcas.

CONCLUSÃO

Realizadas as análises dos resultados é possível concluir que para os testes de determinação de peso médio, desintegração, cinzas sulfatadas, índice de acidez, contagem total de microrganismos mesófilos e pesquisa de microrganismos patogênicos 100% das amostras encontram-se aprovadas. Na determinação do índice peróxidos 50% das amostras foram aprovadas, já para determinação do perfil lipídico limitado as marcas B e D evidenciaram-se inconformidades em 100% das amostras analisadas em relação aos valores nutricionais declarados pelos fabricantes.



Assim os resultados apontam a necessidade de adequação e cumprimento do controle de qualidade previsto pela RDC nº 243, de 26 de julho de 2018 e boas práticas de fabricação preconizadas pela RDC nº 17 de 2010 pelos fabricantes dos produtos e maior fiscalização por parte dos órgãos responsáveis a fim de garantir qualidade e segurança para o consumidor final.

AGRADECIMENTOS

Agradecemos à indústria de alimentos parceira, UNA Bom Despacho e drogarias que cederam vossos dados de venda dos produtos ômega-3.

DECLARAÇÃO DE CONFLITO DE INTERESSES

Nada a declarar.

REFERÊNCIAS

- ANTUNES M.; SOUZA, L. M. G.; CARVALHO, J. R.; VERISSIMO, J. C.; SILVA, K. O.; BRAZ, W. R. Controle de qualidade microbiológico do produto magistral papaína 2% creme comercializado em cidades da região de Bom Despacho-MG. *Revista de Ciências Farmacêuticas Básicas e Aplicadas*, 35 (Supl 1): 31, 2014.
- AOCS. American Oil Chemists Society. *Official and Tentative Methods and recommended practices of the American oil chemists society*. 4 ed, 8-53, 1990.
- ARAYA, J.; RODRIGO, R.; VIDELA, L. A.; THIELEMANN, L.; ORELLANA, M.; PETTINELLI, P.; PONIACHIK, J. Increase in long-chain polyunsaturated fatty acid n-6/n-3 ratio in relation to hepatic steatosis in patients with non-alcoholic fatty liver disease. *Clinical science*, 106 (6): 635-643, 2004.
- BARROS, R. B. Controle de qualidade das cápsulas de fluoxetina industrializadas e manipuladas sendo comercializadas no município de João Pessoa-PB. 2013. Trabalho de conclusão de curso. Universidade Federal da Paraíba, 2013. Disponível em: <https://repositorio.ufpb.br/jspui/handle/123456789/542>. Consultado em: outubro de 2017.
- BELLAVER, C.; ZANOTTO, D. L. Parâmetros de qualidade em gorduras e subprodutos proteicos de origem animal. Palestra apresentada na Conferência Apinco, 1-21, 2004. Disponível em: https://www.agencia.cnptia.embrapa.br/Repositorio/parametros_qualidade_gorduras_e_subprodutos_proteicos_de_origem_animal_000fyrf0t6n02wx5ok0pvo4k33hltk.v.pdf. Consultado em: setembro de 2017.
- BERY, C. C. S.; NUNES, M. L.; SILVA, G. F.; SANTOS, J. A. B.; BERY, C. S. Estudo da Viabilidade do Óleo de Visceras de Peixes Marinhos (*Seriola Dumerlii* (Arabaiana), *Thunnus SSP* (Atum), *Scomberomorus cavala* (Cavala) e *Carcharrhinus spp* (Cação)) Comercializados em Aracaju SE para a Produção de Biodiesel. *Revista GEINTEC*, 2 (3): 297-306, 2012.
- BRASILb. IBGE– Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. *Pesquisa Nacional por Amostra de Domicílios: Síntese de Indicadores-2010 a 2018*, 2018.
- BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. *Informe técnico nº 63, de 03 de outubro de 2014. Dispõe sobre esclarecimentos sobre adição de ingredientes fontes de EPA e DHA em alimentos e bebidas*.
- BRASILa. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. *Resolução RDC nº 243, de 26 de julho de 2018. Dispõe sobre os requisitos sanitários dos suplementos alimentares*.
- BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. *Resolução RDC nº 270, de 22 de setembro de 2005. Dispõe sobre o Regulamento Técnico para Óleos Vegetais, Gorduras Vegetais e Creme Vegetal*.
- BRASILa. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. *Resolução RDC nº 17, de 16 de abril de 2010. Dispõe sobre as Boas Práticas de Fabricação de Medicamentos*.
- BRASILb, *Farmacopeia Brasileira*. 5ª ed. Agência Nacional de Vigilância Sanitária: 546 p, 2010.
- CRUZ, E. S. Controle de qualidade de cápsulas magistrais de hidroclorotiazida manipuladas no município de Lagarto-SE. Trabalho de conclusão de curso. Universidade Federal de Sergipe campus de Lagarto, 2017. Disponível em: https://ri.ufs.br/bitstream/riufs/7467/2/ERICA_DOS_SANTOS_CRUZ.pdf. Consultado em: Outubro de 2017.
- CURI, R.; POMPÉIA, C.; MYASAKA, C. K.; PROCÓPIO, J. *Entendendo a Gordura e os Ácidos Graxos*, 1ª ed.: 580p, Manole, 2001.
- DIAS, P. C. M.; ALVES, J. M. Avaliação da estabilidade oxidativa de cápsulas de concentrado de óleo de peixe. *Revista Eletrônica Estácio Saúde*, 2 (1): 49-56, 2013.
- FRIZON, D. A; OLIVEIRA, J. C. M.; SILVA, E. J.; SILVA, E. C. S. STACHACK, F. F. F.. Determinação de Cinzas em Biodiesel do Óleo de Girassol, de Algodão e de Sebo Bovino. Anais da Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química



- (SBQ), 32: 1-2, 2009. Disponível em: <http://sec.s bq.org.br/cdrom/32ra/resumos/T2389-2.pdf>. Consultado em: outubro de 2017.
- GOMES, R. N. S.; GOMES, V. T. S.; CHAGAS, S. P. A.; LAGO, E. C. Ácido graxo ômega-3 na prevenção e tratamento da hipertensão arterial sistêmica. *Higiene Alimentar*, 30 (256): 33-37, 2016.
- KIECOLT-GLASER, J. K.; BELURY, M. A.; ANDRIDGE, R.; MALARKEY, W. R.; GLASER, R. Omega-3 supplementation lowers inflammation and anxiety in medical students: a randomized controlled trial. *Brain, behavior, and immunity*, 25 (8): 1725-1734, 2011.
- LIMA, I. A. M. Avaliação da qualidade de suplementos alimentares destinados ao auxílio no emagrecimento. Trabalho de conclusão de curso. Universidade de Brasília, 2016. Disponível em: http://b dm.unb.br/bitstream/10483/13839/6/2016_IgorAlvesMotadeLima.pdf. Consultado em: Outubro de 2017.
- MANNA, S.; CHAKRABORTY, T.; DAMODARAN, S.; SAMANTA, K.; RANA, B.; CHATTERJEE, M. Protective role of fish oil (Maxepa) on early events of rat mammary carcinogenesis by modulation of DNA-protein crosslinks, cell proliferation and p53 expression. *Cancer cell international*, 7 (1): 1-10, 2007.
- MARTIN, C. A.; ALMEIDA, V. V.; RUIZ, M. R.; VISENTAINER, J. E. L.; MATSHUSHITA, M.; SOUZA, N. E.; VISENTAINER, J. V. Ácidos graxos poliinsaturados ômega-3 e ômega-6: importância e ocorrência em alimentos. *Revista de Nutrição*, 19 (6): 761-770, 2006.
- MENDES, L. A. B.; PAULA, D. S.; GOMES, J. O.; OLIVEIRA, L. G.; MORAIS, M. G.; CORTEZ, E. N.; SILVA, K. O.; OLIVEIRA JÚNIOR, W. V.; BRAZ, W. R. Avaliação da presença de estafilococos coagulase positiva em "queijo minas artesanal" comercializados na microrregião de Bom Despacho-MG. *Conexão Ciência*, 13 (1): 18-26, 2018.
- MESQUITA, T. R.; SOUZA, A. A.; CONSTANTINO, E.; PELÓGIA, N. C. C.; POSSO, I. P.; PIRES, O. C. Anti-inflammatory effect of dietary supplementation with omega-3 fatty acids in rats. *Revista Dor*, 12 (4): 337-341, 2011.
- MOLINA, B. P.; PAULO, A. S.; RUELA, C. H.; NOBRE, J. A. S.; CÓRDOBA, G. M. C.; OLIVEIRA, R. C. F. Contaminação microbiológica em alimentos proteicos e energético para atletas. *Revista Brasileira de Nutrição Esportiva*, 12 (73): 565-573, 2018.
- MORGANO, M. A.; OLIVEIRA, A. P. F.; RABONATO, L. C.; MILANI, R. F.; VASCONCELLOS, J. P.; MARTINS, C. N.; CITTI, A. L.; TELLES, E. O.; BALLIAN, S. C. Avaliação de contaminantes inorgânicos (As, Cd, Cr, Hg e Pb) em espécies de peixes. *Revista do Instituto Adolfo Lutz*, 70 (4): 497-506, 2011.
- MOTA, T. F.; SOARES, A. F. Análise físico química de cápsulas manipuladas de fluconazol 150 mg. *Revista Científica da Faminas*, 8 (3): 11-23, 2012.
- NASCIUTTI, P. R.; COSTA, A. P. A.; SANTOS JÚNIOR, M. B.; MELO, N. G.; CARVALHO, R. O. A. Ácidos graxos e o sistema cardiovascular. *Enciclopédia Bioesfera*, 11 (22): 11-18, 2015.
- OLIVEIRA, V. C. B.; CAMPOS, R. Estudos de equivalência farmacêutica de comprimidos de ibuprofeno. *Cadernos da Escola de Saúde*, 1 (11): 56-64, 2017.
- PACHECO, S. G. A.; REGINATO-D'ARCE, M. A. B. Estabilidade oxidativa de óleo de peixe encapsulado e acondicionado em diferentes tipos de embalagem em condição ambiente. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, 29 (4): 927-932, 2005.
- PINTO, T. J. A.; KANEKO, T. M.; OHARA, M. T. Controle Biológico de Qualidade de Produtos Farmacêuticos, Correlatos e Cosméticos. 1º ed: 309p., Atheneu, 2000.
- RAPOSO, H. F. Efeito dos ácidos graxos n-3 e n-6 na expressão de genes do metabolismo de lipídeos e risco de aterosclerose. *Revista de Nutrição*, 23 (5): 871-879, 2010.
- SANTOS, R. D. I Diretriz sobre o consumo de gorduras e saúde cardiovascular. *Arquivos Brasileiros de Cardiologia*, 100 (1): 1-40, 2013.
- SILVA, L. O.; SILVA, R. L. Controle de qualidade quanto à determinação de peso nas cápsulas manipuladas em farmácias da cidade de Mogi Guaçu, SP. *Revista Foco*, 5 (7): 41-60, 2014.
- SIMCH, F. H. Testes aplicados em estudos de equivalência farmacêutica. Trabalho de conclusão de curso. Universidade Federal do Paraná, 2013. Disponível em: <https://acervodigital.ufpr.br/bitstream/handle/1884/35165/RelatorioEstagioFinalpdf.pdf?sequence=1&isAllowed=y>. Consultado em: setembro de 2017.
- SIMOPOULOS, A. P. Omega-3 fatty acids in inflammation and autoimmune diseases. *Journal of the American College of nutrition*, 21 (6): 495-505, 2002.
- TEIXEIRA, L. C.; GARCIA, P. P. C. Qualidade do pescado: captura, conservação e contaminação. *Acta de Ciências e Saúde*, 1 (2): 1-15, 2016.
- TONELOTTO, A.; NASCIMENTO, B.; VENTURE, G.; NETO, G.; LESSA, L.; ANTUNES, R.; NAYARA, T. Determinação do teor de cinzas. *Roteiro Centro Paula Souza*, 1 (1): 1-7, 2010.
- VAZ, D. S. S.; GUERRA, F. M. R. M.; GOMES, C. F.; SIMÃO, A.



N. C.; MARTINS JÚNIOR, F. A importância do ômega 3 para a saúde humana: um estudo de revisão. *Revista Unigá Review*, 20 (2): 48-54, 2014.

VERDI, S.; YOUNES, S.; BERTOL, C. D. Avaliação da qualidade microbiológica de cápsulas e chás de plantas utilizadas na assistência ao tratamento da obesidade. *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais*, 15 (4): 494-502, 2013.

VIDOTTI, R. M.; GONÇALVES, G. S. Produção e caracterização de silagem, farinha e óleo de tilápia e sua utilização

na alimentação animal. Centro Avançado de Pesquisa Tecnológica do Agronegócio do Pescado Continental Instituto de Pesca, 2006. Disponível em: https://www.pesca.sp.gov.br/producao_caracterizacao.pdf. Consultado em setembro de 2017.

Influência das condições de cultivo sobre a produção de óleo essencial do capim citronela (*Cymbopogon nardus*)

*Influence of cultivation conditions on the production of essential oil of citronella grass (*Cymbopogon nardus*)*

BRAGA, K.A.S.¹; CASTRO, H.G.^{1*}; TEIXEIRA, V.L.S.¹; BARBOSA, L.C.A.²; DEMUNER, A.J.²

¹ Universidade Federal de Juiz de Fora- UFJF, Juiz de Fora/MG, Brasil,

² Universidade Federal de Viçosa- UFV, Viçosa/MG, Brasil;

***Autor Correspondente:** Henrique Guilhon de Castro

Rua José Lourenço Kelmer, S/N, Bairro São Pedro, Juiz de Fora/MG- CEP: 36036-900

Telefone: 32-99995-0345

E-mail: henrique.castro@ufjf.edu.br

DOI: <https://doi.org/10.29327/226760.2.1-5>

RESUMO

A produção de princípios ativos pelas plantas medicinais pode ser influenciada pelo ambiente de cultivo. O estudo de tais condições é fundamental para se ter uma produção de material vegetal de melhor qualidade. Desta forma, este estudo teve por objetivo avaliar o efeito do uso da adubação orgânica no crescimento, na produção de biomassa e no teor e composição do óleo essencial do capim citronela (*Cymbopogon nardus*) sob as condições edafoclimáticas de Juiz de Fora- MG. A extração do óleo essencial foi realizada por hidrodestilação utilizando o aparelho de Clevenger adaptado e a identificação dos compostos químicos por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa (CG-EM). As plantas apresentaram, no tratamento com adubação orgânica, aos 174 dias de transplante, uma produção de biomassa fresca de 1071,75g planta⁻¹, estimando uma produtividade de 21,44 t ha⁻¹. O teor de óleo essencial das amostras foi de 1,06% no tratamento sem adubação e 0,82% no tratamento com adubação. A técnica de CG-EM permitiu que fossem identificados 14 compostos químicos no óleo essencial do capim citronela. Os compostos majoritários foram o trans- β -geraniol, o citronelal e o β -citronelol. Os resultados obtidos permitem estimar uma produtividade de 79,20 Kg ha⁻¹ de óleo volátil para o tratamento com adubação e 64,45 Kg ha⁻¹ para o tratamento sem adubação. No primeiro tratamento obteve-se um menor teor de óleo e uma maior produção de biomassa, resultando em uma maior produção de óleo essencial por hectare.

Palavras-chave: *Cymbopogon nardus*. Óleo essencial. Plantas medicinais. Capim citronela. Adubação orgânica.

ABSTRACT

The production of active principles by medicinal plants can be influenced by the cultivation environment. The study of these conditions is essential to produce a better quality plant material. Thus, this paper aimed to evaluate the effect of the use of organic fertilization on the growth, on biomass production and on the essential oil content and composition of citronella grass (*Cymbopogon nardus*) under the edaphoclimatic conditions of Juiz de Fora-MG. The extraction of the essential oil was carried out through hydrodistillation using an adapted Clevenger equipment and the identification of the chemical compounds by gas chromatography coupled to mass spectrometry. The plants presented in the treatment with organic fertilizing, at 174 days of transplant, a production of fresh biomass of 1071.75 g plant⁻¹, estimating a productivity of 21.44 t ha⁻¹. The content of essential oil was of 1.06% in the treatment without fertilizing and 0.82% in the treatment with fertilizing. The technique of GC-MS allowed the identification of 14 chemical compounds in the citronella grass essential oil. The majority compounds of the oil were trans- β -geraniol, citronellal and β -citronellol. The results allow to estimate a productivity of volatile oil of 79.20 kg ha⁻¹ for the treatment with fertilizing and 64.45 kg ha⁻¹ for the treatment without fertilizing. In the first treatment a lower oil content and a higher production of biomass were obtained resulting in a higher production of essential oil for hectare.

Keyword: *Cymbopogon nardus*. Essential oil. Medicinal plants. Citronella grass. Organic fertilizing



INTRODUÇÃO

Na área de plantas medicinais os estudos estão associados, preferencialmente, ao conhecimento da composição química das espécies que produzem fitofármacos. Os processos genéticos e ambientais influenciam a produção dos compostos ativos nas plantas medicinais e devem ser avaliados para a melhoria da qualidade da matéria-prima. Dentro deste contexto é fundamental que a produção das plantas medicinais considere as condições edafoclimáticas regionais, uma vez que a produção de princípios ativos pelas mesmas pode ser afetada pelo ambiente de cultivo (SANTOS, INNECCO, 2004).

A adubação orgânica em plantas medicinais, além de ser parte essencial dos sistemas de cultivo orgânico, fornece nutrientes, proporciona benefícios na estrutura física do solo, aumenta a retenção de água, diminui as perdas por erosão e favorece o controle biológico de pragas e doenças (SOARES et al., 2014).

O capim citronela (*Cymbopogon nardus*) é uma planta originada do Ceilão e da Índia pertencente à família *Poaceae*. Essa espécie possui uso na medicina popular como calmante e digestivo. O óleo essencial de *C. nardus* tem sido tradicionalmente usado como repelente de insetos (BILLERBECK et al., 2001; CASTRO et al., 2010).

Os óleos essenciais são metabólitos secundários considerados produtos finais do metabolismo das plantas e têm importância ecológica para os vegetais que os sintetizam, como fornecer proteção contra o ataque de organismos patogênicos (SILVA et al., 2008). Os óleos essenciais são misturas complexas que podem conter mais de cem compostos orgânicos, os quais pertencem a diversas classes químicas. A classe dos terpenos é a mais comum encontrada como constituinte dos óleos essenciais e os monoterpenos e sesquiterpenos são as substâncias predominantes (BARBOSA et al., 2016; RIBEIRO et al., 2018).

Na maioria dos casos a atividade biológica de um óleo essencial particular pode estar relacionada com o constituinte majoritário, embora possa ocorrer sinergismo entre alguns compostos (FILOMENO et al., 2017). A utilização de óleos essenciais ou extratos botânicos no controle de organismos patogênicos têm sido frequentemente relatados em artigos publicados. A inibição do desenvolvimento de fungos pode ser tanto por sua ação direta, inibindo o crescimento micelial e a germinação de esporos, quanto pela indução de resistência a diversos patógenos (DONLAPORN, SUNTORNUSUK, 2010; DEUS et al., 2011; GARCIA et al., 2012; PASSOS et al., 2012).

O óleo essencial extraído de *C. nardus* apresenta alto teor de geraniol e citronelal. O geraniol possui atividade anti-séptica, inibindo o crescimento de fungos e bactérias, enquanto o citronelal é utilizado como material básico para a síntese de vitamina A e de importantes compostos químicos denominados iononas. O óleo essencial de *C. nardus* também apresenta atividade repelente a insetos e é utilizado na fabricação de perfumes e cosméticos (MUMCUOGLU et al., 2004; TRONGTOKIT et al., 2005; WONG et al., 2005; AGNOLIN et al., 2014).

Considerando que a composição química pode ser influenciada pelas condições de cultivo, este estudo teve por objetivo avaliar o efeito do uso da adubação orgânica no crescimento, produção de biomassa e no teor e composição do óleo essencial de *C. nardus* nas condições edafoclimáticas do município de Juiz de Fora- MG.

METODOLOGIA

Crescimento e produção de biomassa

Os experimentos foram conduzidos na estação experimental de campo da Universidade Federal de Juiz de Fora, campus de Juiz de Fora- MG (21° 76' sul e 43° 36' oeste, com altitude média de 940 m). A exsiccata



com amostra do material vegetal foi depositada no herbário da Universidade Federal de Viçosa com o número VIC 30283.

A coleta das amostras simples (subamostras) para a análise química do solo foi realizada na profundidade de 20 cm com o auxílio de uma pá. As amostras simples (oito amostras), coletadas ao acaso, foram misturadas em um balde de plástico para formar a amostra composta. Após a formação da amostra composta separou-se 500 g de solo que foi encaminhada ao laboratório (Laboratório de Análise de Solo, Tecido Vegetal e Fertilizante da Universidade Federal de Viçosa).

A análise química do solo da área experimental apresentou os seguintes resultados: pH (H₂O) = 6,1; H⁺ + Al⁺⁺⁺ = 4,0 cmolc dm⁻³; Ca⁺⁺ = 5,43 cmolc dm⁻³; Mg⁺⁺ = 0,89 cmolc dm⁻³; P-rem = 24,6 mg L⁻¹; K⁺ = 74 mg dm⁻³; matéria orgânica = 4,16 dag Kg⁻¹; CTC = 61,9 cmolc dm⁻³ e V (%) = 61,9%.

O delineamento experimental foi blocos casualizados em esquema fatorial 5 x 2, com quatro repetições e oito plantas, totalizando 10 tratamentos e 40 unidades experimentais. Os tratamentos foram constituídos por cinco épocas de amostragem em intervalos regulares de 21 dias (90, 111, 132, 153 e 174 dias após o transplante), associados com e sem adubação orgânica (húmus) (3 L cova⁻¹). O húmus foi adquirido no comércio de Juiz de Fora (loja de produtos agropecuários).

As mudas foram obtidas de plantas matrizes existentes no Campus Universitário de Juiz de Fora por divisão de touceiras, utilizando no plantio 1 perfilho cova⁻¹.

As seguintes características foram avaliadas: massa fresca, massa seca, massa desidratada, vigor, altura, circunferência do caule, número de folhas, número de perfilhos, comprimento da maior folha e largura da maior folha (SOARES et al., 2014). Na obtenção da

massa seca, amostras da massa fresca foram mantidas em estufa com circulação e renovação de ar (SOLAB) a 70°C por 72 h, até atingir massa constante.

Análise do óleo essencial

Na extração do óleo essencial foi utilizado a parte aérea de plantas de *C. nardus*, em triplicata. O óleo essencial foi obtido por hidrodestilação por um período de 1 h e 30 minutos, utilizando-se aparelho Clevenger a partir de amostras da parte aérea da planta desidratada (22 gramas). As amostras foram colocadas em balão de fundo redondo contendo 750 mL de água destilada que foi acoplado ao Clevenger (VELOSO et al., 2012).

O óleo essencial foi extraído da fase aquosa com funil de separação, utilizando-se diclorometano como solvente. As frações orgânicas obtidas foram reunidas e secadas com sulfato de sódio anidro, filtradas, enquanto o solvente removido em banho-maria a 60°C.

A análise qualitativa dos constituintes do óleo foi realizada em aparelho Shimadzu GCMS-QP5050A, equipado com coluna de sílica fundida DB-5 (30 m x 0,25 mm, espessura do filme de 0,25 µm) e acoplado ao espectrômetro de massas. O gás Hélio foi utilizado como gás de arraste com fluxo de 1,8 mL min⁻¹; temperatura do injetor 220°C, temperatura inicial da coluna 40°C, isoterma por 2 min., seguido de aquecimento de 3°C min⁻¹ até 240°C, mais isoterma por 15 min.; volume de injeção 1,0 µL (1% p/v em CH₂Cl₂); razão de Split 1: 10; pressão da coluna 100 kPa; temperatura da interface 240°C; ionização por impacto de elétrons (70 eV).

Após a identificação dos constituintes dos óleos essenciais, a determinação do teor de cada composto foi realizada por cromatografia gasosa utilizando o cromatógrafo Shimadzu, modelo 17A, conectado ao detector de ionização de chamas (CG-DIC) equipado



com uma coluna capilar de sílica fundida (SBP5-Supelco, 30 m x 0,25 mm d.i, espessura do filme de 0,25 μ m). A temperatura da coluna foi programada para variar de 40 °C (4 min.) a 200 °C a uma taxa de 3 °C min⁻¹. O injetor e o detector foram mantidos a 200 °C e 240 °C, respectivamente. O gás de arraste foi o nitrogênio a uma taxa de fluxo de 1,8 mL mL⁻¹. A quantidade de 1,0 μ L (solução do óleo essencial 1% m/v em CH₂CL₂) foi injetada e a razão de split foi de 1:10.

As análises foram realizadas em triplicata e a concentração de cada constituinte foi calculada pela porcentagem da área do pico correspondente em relação à área total dos picos. A identificação dos constituintes de cada mistura de óleo foi realizada pela comparação de seus tempos de retenção, relativos à série de alcanos (C₈ – C₁₈), e pela comparação dos espectros de massa com o banco de dados da biblioteca Wiley 7 e com a literatura (ADAMS, 2007).

Análise estatística

Os dados foram interpretados por meio de análises de variância e de regressão. No fator adubação orgânica as médias foram comparadas pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade. No fator época de amostragem foram ajustadas equações de regressão com base no teste "t" dos coeficientes a 5 ou 1% de probabilidade e no coeficiente de determinação. Nas variáveis biomassa fresca, seca e desidratada as médias foram comparadas pelo teste de Wilcoxon a 5% de probabilidade.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Crescimento e produção de biomassa

Nas condições em que foi realizado o estudo, de modo geral, observou-se que as plantas que foram adubadas com húmus apresentaram melhor performance em todas as características avaliadas (Tabela 1).

Em ambos os tratamentos, com e sem adubação orgânica, observou-se que a altura aumentou linearmente em função do tempo. As plantas sem adubação orgânica apresentaram maiores taxas de crescimento em altura de plantas a cada intervalo de tempo, atingindo aos 174 dias após o plantio, 81,12 cm planta⁻¹. Por outro lado, as plantas com adubação orgânica apresentaram, de acordo com as equações de regressão ajustadas, menor taxa de crescimento, mas com maior altura na última época de avaliação, 95,52 cm planta⁻¹ (Tabela 1). A maior altura das plantas no tratamento com adubação orgânica, na última época de avaliação, está relacionada com o maior crescimento das plantas neste tratamento no período que antecedeu a primeira época de avaliação.

No estudo realizado por SOARES et al., (2014) no estado do Tocantins, semelhante ao presente estudo, não foi observada diferença significativa entre os tratamentos em todas as épocas de amostragem. Contudo, a citronela adubada organicamente, com 9 Kg cova⁻¹ de esterco, apresentou a maior taxa de crescimento em altura, 0,54 cm dia⁻¹, atingindo na última época de amostragem 113,59 cm.

Outros estudos realizados com adubação orgânica também foram influenciados positivamente quanto ao crescimento de plantas medicinais como manjerição anis (*Ocimum selloi* L.) (COSTA et al., 2008a) e na produção de matéria seca de capítulos de calêndula (*Calendula officinalis* L.) (VALADARES et al., 2010).

Quanto ao vigor, nos dois tratamentos avaliados não foi ajustado nenhum modelo de regressão para explicar a variação dos dados. O tratamento com adubação orgânica apresentou, em todas as épocas de avaliação, os maiores valores de vigor das plantas (Tabela 1).

Tabela 1 - Valores médios, equações de regressão e coeficiente de determinação (r^2) de *C. nardus* nas variáveis: altura, circunferência do caule, vigor, número de folhas, número de perfilhos, comprimento da maior folha e largura da maior folha, em cinco épocas de amostragem (Com: com adubação orgânica; Sem: sem adubação orgânica; AO: adubação orgânica; e EP: épocas de amostragem).

Épocas de amostragem (dias após plantio)							
AO	90	111	132	153	174	Equações de regressão	r^2 (%)
Altura (cm planta-1)							
Com	46,38 ± 21,2a	63,38 ± 3,7a	69,5 ± 3,1a	81 ± 5,7a	97,5 ± 4,1a	$Y = -3,8 + 0,5708 EP^{**}$	77,23
Sem	23,13 ± 4,7a	41 ± 13,2a	50,75 ± 14,6a	65,5 ± 17,9a	82,25 ± 20,6a	$Y = -37,2 + 0,68 EP^{**}$	69,90
Circunferência do caule (cm planta-1)							
Com	5,88 ± 2,3a	6,75 ± 2,4a	9,25 ± 4,0a	13,38 ± 5,5a	20,25 ± 11,6a	$y = -11,14 + 0,1685 EP^{**}$	44,25
Sem	3,5 ± 2,4a	4,38 ± 3,2a	6,38 ± 4,5a	7,75 ± 4,1a	12,38 ± 6,9b	$y = -6,4 + 0,1006 EP^{**}$	35,92
Vigor							
Com	3,5 ± 1,29a	3,3 ± 1,3a	3,8 ± 1,0a	4 ± 0,8a	4 ± 0,8a	$y = 3,7$	
Sem	3,3 ± 1,8a	2,3 ± 1,3a	2,3 ± 1,0b	2,5 ± 1,3b	3,3 ± 1,0a	$y = 2,7$	
Número de folhas							
Com	6,3 ± 3,95a	8,3 ± 4,0a	14 ± 7,8a	27 ± 12,2a	42,3 ± 20,4a	$y = -37,5 + 0,4321 EP^{**}$	58,88
Sem	5,5 ± 5,8a	7,3 ± 5,3a	11 ± 6,7a	17 ± 8,8a	34 ± 19,3a	$y = -27,0 + 0,3179 EP^{**}$	47,01
Número de perfilhos							
Com	1,5 ± 0,58a	1,5 ± 0,6a	5 ± 3,7a	6,3 ± 2,5a	12 ± 4,8a	$y = -10,94 + 0,1226 EP^{**}$	61,72
Sem	1,5 ± 1,0a	1,5 ± 1,0a	2,3 ± 1,5a	3,5 ± 0,6a	9,3 ± 6,5a	$y = -7,4 + 0,0833 EP^{**}$	39,41
Comprimento da maior folha (cm planta-1)							
Com	38,8 ± 6,34a	52,5 ± 1,3a	55,5 ± 3,5a	67,3 ± 3,6a	79,8 ± 2,2a	$y = -2,06 + 0,4607 EP^{**}$	92,05
Sem	29 ± 12,2a	36,25 ± 14,8b	43,5 ± 13,1a	54 ± 15,3a	72,8 ± 9,2a	$y = -19,1 + 0,5012 EP^{**}$	61,31
Largura da maior folha (cm planta-1)							
Com	1,9 ± 0,46a	2,1 ± 0,4a	2,2 ± 0,3a	2,2 ± 0,3a	2,3 ± 0,2a	$y = 2,1$	
Sem	1,5 ± 0,6a	1,5 ± 0,6a	1,5 ± 0,6b	1,8 ± 0,3a	2,1 ± 0,1a	$y = 1,7$	

Os dados referem-se à média de quatro repetições ± desvio padrão. Médias seguidas pela mesma letra na coluna, em cada variável, não diferem entre si pelo teste de Tukey ($P > 0,05$); ** = significativo a 1% de probabilidade pelo teste "t".

Tabela 2 - Valores médios nas variáveis biomassa fresca e seca de *C. nardus* (COM e SEM adubação orgânica).

Adubação	Biomassa fresca (g planta-1)	Biomassa seca (g planta-1)	Biomassa desidratada (g planta-1)
COM	1071,75 ± 241 a	344,14 ± 77,3 a	386,36 ± 86,8 a
SEM	684,25 ± 149,3 b	220,19 ± 48,1 b	243,22 ± 53,1 b

Os dados referem-se à média de quatro repetições ± desvio padrão. Médias seguidas pela mesma letra na coluna, em cada variável, não diferem entre si pelo teste de Wilcoxon ($P > 0,05$).

SOARES et al., (2014) observaram que as plantas do capim citronela tratadas com adubo orgânico apresentaram-se mais vigorosas e com desenvolvimento vegetativo melhor, além de uma coloração mais verde. Em outro estudo, COSTA et al., (2008b) obtiveram resultados parecidos no cultivo de capim-limão (*Cymbopogon citratus*) adubado com esterco avícola.

Nas variáveis número de folhas e número de perfilhos não houve diferença estatística ($P > 0,05$) entre os tratamentos em todas as épocas de avaliação. Entretanto, o tratamento com adubação apresentou maior taxa de crescimento em número de folhas e número de perfilhos (Tabela 1).

Na análise destrutiva o tratamento com adubação orgânica apresentou valores de biomassa fresca, biomassa seca e desidratada significativamente maiores que o tratamento sem adubação orgânica (Tabela 2). O maior valor de biomassa apresentado no tratamento com adubação orgânica está associado com o maior fornecimento de nutrientes nesse tratamento e a sua influência na estrutura do solo com o aumento da porosidade e maior infiltração e retenção de água no solo.

No tratamento com adubação orgânica a produção de biomassa fresca planta-1 permite estimar uma produtividade de aproximadamente 21,44 t ha-1.

No plantio o número de perfilhos cova-1 exerce influência direta na produção de biomassa das plantas de *C. nardus*. PERINI et al., (2011) analisaram

o plantio do capim citronela utilizando um perfilho cova-1 (mesmo número de perfilhos do presente estudo), atingindo a produtividade de 20,05 t ha-1 de biomassa fresca. No estudo de SOARES et al., (2014) e CASTRO et al., (2007) utilizou-se três perfilhos cova-1 e a produtividade foi de 61,63 t ha-1 e 66,11 t ha-1 de biomassa fresca, respectivamente.

Em outro estudo com capim-limão, os autores relataram que a adubação orgânica das plantas acarretou em uma maior produção de biomassa seca. Este resultado também foi observado no cultivo de mentrasto (*Ageratum conyzoides*), onde houve incremento de biomassa das plantas no tratamento com adubo orgânico comparado com os tratamentos utilizando adubação mineral e calagem (COSTA et al., 2008b).

Análise do óleo essencial

A análise do óleo essencial (OE) por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas resultou na identificação de quatorze constituintes no óleo essencial das folhas de *C. nardus*. Os compostos identificados foram classificados como monoterpenos e sesquiterpenos (Tabela 3).

O teor de óleo essencial obtido da parte aérea das plantas de *C. nardus* no tratamento com adubação orgânica permite a projeção da produção de 79,20 kg ha-1 de óleo essencial, enquanto no tratamento sem adubação a produção de 64,45 kg ha-1.

No tratamento com adubação foi obtido menor teor



de óleo (0,82 %) (Tabela 3) em relação ao tratamento sem adubação, mas observou-se maior produção de biomassa no tratamento com adubação (Tabela 2). A maior produção de biomassa no tratamento com adubação resultou em uma maior produção de óleo essencial por hectare, sabendo que o teor de óleo essencial foi calculado com base em uma amostra de 22 gramas para ambos os tratamentos. Dessa forma, conforme foi verificado no presente estudo, a maior produção de biomassa pode compensar o menor teor de óleo essencial resultando em uma maior produção de óleo essencial por área de cultivo.

Ensaio realizado com adubação orgânica elevou o rendimento médio de OE do capim-limão e mentrasto. Observação semelhante foi feita em outros estudos, nos quais o uso de biofertilizante aumentou diretamente o rendimento de óleo (COSTA et al., 2008b).

OLIVEIRA et al., (2011) comparou o teor dos OE de *C. nardus* e *C. citratus*. O primeiro apresentou teor de óleo essencial de 1,39% e o segundo 2,27%. Ambos possuem como constituintes majoritários os monoterpenos, mas o óleo de capim-limão apresentou maior teor de geraniol (42,92%) enquanto no óleo do capim citronela verificou-se concentração elevada do composto citronelal (34,61%).

Os compostos majoritários identificados no OE foram o trans- β -geraniol seguido do citronelal e do β -citronelol. Em ambos os tratamentos - com e sem adubação orgânica - observou-se que os monoterpenos constituíram mais de 70% dos compostos identificados do óleo essencial de *C. nardus* (Tabela 3).

Os monoterpenos geralmente são mais voláteis que os sesquiterpenos, tendo maior influência sobre o aroma dos óleos essenciais. Entretanto, os sesquiterpenos também podem influenciar o efeito

olfativo dos óleos essenciais, mesmo que em menor proporção que os monoterpenos (CASTRO et al., 2010; VELOSO et al., 2012).

Resultados semelhantes obtidos em outros projetos de pesquisas corroboraram os resultados do presente estudo em relação aos compostos majoritários, embora tenha observado nestes estudos variação no número de compostos identificados e na sua concentração relativa (VELOSO et al., 2012; CASTRO et al., 2007; ANDRADE et al., 2012; SCHERER et al., 2009).

De acordo com CASTRO et al., (2010), comparando diferentes épocas de colheita de *C. nardus*, a concentração relativa de monoterpenos foi maior que a de sesquiterpenos em todas as épocas. Na segunda época observou-se o maior teor de óleo essencial (1,10%) e o geraniol foi o constituinte predominante (38,40%).

MAHALWAL, ALI, (2002) observaram que os componentes majoritários do OE de *C. nardus* foram os monoterpenos citronelal (29,7%) e o geraniol (24,2%) e os sesquiterpenos majoritários o (E)-nerolidol (4,8%) e o β -cariofileno (2,2%). NAKAHARA et al., (2003) observaram diferenças em relação aos outros estudos, pois apesar do geraniol (35,7%) estar em maior concentração, o segundo composto em maior concentração foi o trans-citral (22,7%).

Segundo SILVEIRA et al., (2012), os compostos majoritários encontrados no óleo de citronela-de-Java (*C. winterianus*) foram o citronelal (41,48%), geraniol (19,63%) e α -citronelol (10,44%).

Os resultados não são uniformes devido às diferenças ambientais que levam a interconversões dinâmicas entre os constituintes dos óleos essenciais, o que pode ser devido as reações de redução, oxidação, desidratação e hidratação, isomerização e ciclização (SANTOS et al., 2012). Por exemplo, a maior concentração de citronelal pode ser resultado da

Tabela 3 - Concentração relativa (área %), obtida por cromatografia gasosa e espectrometria de massas, dos constituintes do óleo essencial da parte aérea de *Cymbopogon nardus*, cultivado com e sem adubo orgânico.

Compostos	IAC	IA tab	Presença de adubo orgânico	
			Com	Sem
Monoterpenos oxigenados				
Citronelal	1157	1148	18,75 ± 1,10	22,01 ± 1,24
β -Citronelol	1234	1223	13,13 ± 0,37	11,94 ± 0,17
trans- β -Geraniol	1263	1249	34,76 ± 1,08	32,51 ± 0,60
Acetato de citronelila	1355	1350	4,55 ± 0,07	4,83 ± 0,22
Acetato de geranila	1385	1379	3,43 ± 0,63	4,16 ± 0,15
Subtotal:			74,72	75,45
Sesquiterpenos hidrocarbonetos				
β -Elemeno	1390	1389	0,35 ± 0,07	0,36 ± 0,06
Germacreno D	1480	1484	0,79 ± 0,20	0,83 ± 0,07
α -Muroleno	1498	1500	0,54 ± 0,10	0,53 ± 0,04
γ -Patchuleno	1502	1502	-	0,25 ± 0,02
γ -Cadineno	1513	1513	0,21 ± 0,14	-
δ -Cadineno	1522	1522	0,79 ± 0,10	0,96 ± 0,07
Germacreno B	1552	1559	3,78 ± 0,33	3,61 ± 0,14
Subtotal:			6,46	6,54
Sesquiterpenos oxigenados				
α -Cadinol	1657	1652	3,67 ± 0,32	3,65 ± 0,10
14-hidroxi-9-epi-(E)-cariofileno	1670	1668	-	2,08 ± 0,12
Subtotal:			3,67	5,73
Teor dos compostos identificados			84,85	87,72
Teor de óleo essencial (%)			0,82 ± 0,05	1,06 ± 0,33

Os dados referem-se à média de três repetições ± desvio padrão. IAC: índice aritmético calculado; IA tab: índice aritmético tabelado.

oxidação do citrionelol. O geranial e o neral são esteroisômeros e podem originar o citral (OLIVEIRA et al., 2011).

Os três compostos predominantes no óleo essencial de *C. nardus* deste estudo são monoterpenos e possuem estrutura química muito semelhante indicando uma possível interconversão conforme a necessidade da planta ou as exigências do meio. Acredita-se que haja uma possível plasticidade química da espécie para produzir os compostos mais necessários. A interconversão dos componentes de um a outro é determinada geneticamente pela expressão da regulação gênica e pode ser afetada por fatores agrônômicos (GARLET et al., 2007; MEDEIROS, 2014).

A principal causa de diversidade dos terpenos se relaciona com a presença de várias enzimas regulatórias responsáveis pelas sínteses dos mesmos. Portanto, a síntese de um ou mais produtos é influenciada pela disponibilidade de substratos para sintetizar outros compostos, pois uma enzima pode

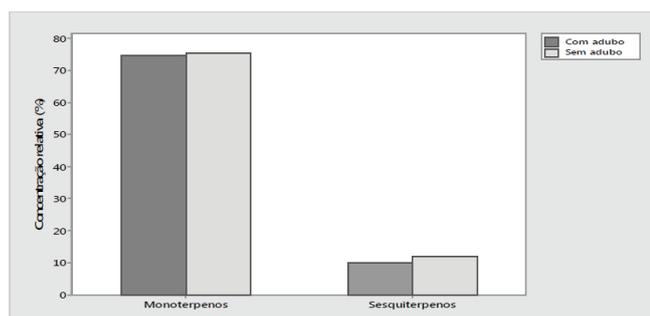


Figura 1 - Porcentagem relativa de monoterpenos e sesquiterpenos do óleo essencial de *Cymbopogon nardus* (sem adubo orgânico e com adubo orgânico).

formar vários terpenos a partir de um único substrato (STORCK, DERCHAMPS, 2015). Estas diferenças químicas entre os óleos essenciais podem refletir diretamente nas propriedades funcionais, como a atividade antimicrobiana e antioxidante (SCHERER et al., 2009).

CONCLUSÃO

No presente estudo verificou-se influência da adubação orgânica na produção de biomassa e na variação do teor e composição do óleo essencial de *C. nardus*. A produção de biomassa foi favorecida significativamente pela adubação orgânica.

No tratamento com adubação orgânica observou-se redução no teor de óleo essencial em comparação com o tratamento sem adubação. Os óleos essenciais possuem substâncias defensivas para as plantas e o estresse nutricional (tratamento sem adubação), possivelmente, pode estimular a produção desses constituintes. De modo geral, foram observadas diferenças quantitativas e qualitativas na constituição química do óleo essencial de *C. nardus*. O efeito da adubação orgânica sobre o teor e composição do óleo essencial requer a realização de outros estudos, considerando que a produção de metabólitos secundários não é sempre estimulada pela adubação orgânica devido a influência concomitante de fatores fisiológicos, da constituição genética da planta e de condições ambientais.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADAMS, R.P. Identification of essential oil components by gas chromatography /mass spectrometry. 4th ed. Allured Publishing Corporation. Carol Stream, Illinois, 2007, 804p.
- AGNOLIN, C.A.; OLIVO, C.J.; PARRA, C.L.C.; AGUIRRE, C.A.; BEM, C.M.; ZENI, D.; MOREL, A.F. Eficácia acaricida do óleo de citronela contra o *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. Rev. Bras. Saúde Prod. Anim., 15 (3): 604-612, 2014.
- ANDRADE, M.A.; CARDOSO, M.G.; BATISTA, L.R.; MALLET, A.C.T.; MACHADO, S.M.F. Óleos essenciais de *Cymbopogon nardus*, *Cinnamomun zeylanicum* e *Zingiber officinale*: composição, atividades antioxidante e antibacteriana. Rev. Ciênc. Agron., 43 (2): 399-408, 2012.
- BARBOSA, L.C.A.; FILOMENO, C.A.; TEIXEIRA, R.R. Chemical variability and biological activities of *Eucalyptus spp.* essential oils. Molecules, 21 (12): 1671-1704, 2016.
- BILLERBECK, V.G.; ROQUES, C.G.; BESSIÈRE, J.M.; FONVIEILLE, J.L.; DARGENT, R. Effects of *Cymbopogon nardus* (L.) W.



- Watson essential oil on the growth and morphogenesis of *Aspergillus niger*. *Can. J. Microbiol.*, 47 (1): 9-17, 2001.
- CASTRO, H.G.; PERINI, V.B.M.; SANTOS, G.R.; LEAL, T.C.A.B. Avaliação do teor e composição do óleo essencial de *Cymbopogon nardus* (L.) em diferentes épocas de colheita. *Rev. Ciênc. Agron.*, 41 (2): 308-314, 2010.
- CASTRO, H.G.; BARBOSA, L.C.A.; LEAL, T.C.A.B.; SOUZA, C.M.; NAZARENO, A.C. Crescimento, teor e composição do óleo essencial de *Cymbopogon nardus* (L.). *Rev. Bras. Plantas Med.*, 9 (4): 55-61, 2007.
- COSTA, L.C.B.; PINTO, J.E.B.P.; CASTRO, E.M.; BERTOLUCCI, S.K.V.; CORRÊA, R.M.; REIS, E.S.; ALVES, P.B.; NICULAU, E.S. Tipos e doses de adubação orgânica no crescimento, no rendimento e na composição química do óleo essencial de elixir paregórico. *Cienc. Rural*, 38 (8): 2173-2180, 2008a.
- COSTA, L.C.B.; ROSAL, L.F.; PINTO, J.E.B.P.; BERTOLUCCI, S.K.V. Efeito da adubação química e orgânica na produção de biomassa e óleo essencial em capim-limão (*Cymbopogon citratus* D.C.). *Rev. Bras. Plantas Med.*, 10 (1): 16-20, 2008b.
- DEUS, R.J.A.; ALVES, C.N.; ARRUDA, M.S.P. Avaliação do efeito antifúngico do óleo resina e do óleo essencial de copaíba (*Copaifera multijuga* Hayne). *Rev. Bras. Plantas Med.*, 13 (1): 1-7, 2011.
- DONLAPORN, S.; SUNTORNSUK, W. Antifungal activities of ethanolic extract from *Jatropha curcas* Seed Cake. *J. Microbiol. Biotechnol.*, 20 (2): 319-324, 2010.
- FILOMENO, C.A.; BARBOSA, L.C.A.; TEIXEIRA, R.R.; PINHEIRO, A.L.; FARIAS, E.S.; SILVA, E.M.P.; PICANÇO, M.C. *Corymbia* spp. and *Eucalyptus* spp. essential oils have insecticidal activity against *Plutella xylostella*. *Ind Crops Prod*, 109: 374-383, 2017.
- GARLET, T.M.B.; SANTOS, O.S.; MEDEIROS, S.L.P.; MANFRON, P.A.; GARCIA, D.C.; BORCIONI, E.; FLEIG, V. Produção e qualidade do óleo essencial de menta em hidroponia com doses de potássio. *Cienc. Rural*, 37 (4): 956-962, 2007.
- GARCIA, R.A.; JULIATTI, F.C.; BARBOSA, K.A.G.; CASSEMIRO, T.A. Atividade antifúngica de óleo e extratos vegetais sobre *Sclerotinia sclerotiorum*. *Biosci. J.*, 28 (1): 48-57, 2012.
- MAHALWAL, V. S.; ALI, M. Volatile constituents of *Cymbopogon nardus* (Linn.) Rendle. *Flavour Fragr. J.*, 18 (1): 73-76, 2002.
- MEDEIROS, F.C.M. Caracterização química e atividade biológica de óleos essenciais de plantas do cerrado contra fungos xilófagos [Dissertação Mestrado]. [Brasília (DF)]: Programa de Pós-graduação em Ciências Florestais, Universidade de Brasília; 2014. 108p.
- MUMCUOGLU, K.Y.; MAGDASSI, S.; MILLER, J.; BEN-ISHAI, F.; ZENTNER, G.; HELBIN, V.; KAHANA, F.; INGBER, A. Repellency of citronella for head lice: double-blind randomized Trial of efficacy and safety. *Isr. Med. Assoc. J.*, 6 (12): 756-759, 2004.
- NAKAHARA, K.; ALZOREKY N.S.; YOSHIHASHI, T.; NGUYEN, H.T.T.; TRAKOONTIVAKORN, G. Chemical composition and antifungal activity of essential oil from *Cymbopogon nardus* (citronela grass). *Jpn. Agr. Res. Q.*, 37 (4): 249-252, 2003.
- OLIVEIRA, M. M. M.; BRUGNERA, D. F.; CARDOSO, M. G.; GUIMARÃES, L.G. L.; PICOLLI, R. H. Rendimento, composição química e atividade antilisterial de óleos essenciais de espécies de *Cymbopogon*. *Rev. Bras. Plantas Med.*, 13 (1): 8-16, 2011.
- PASSOS, J.L.; BARBOSA, L.C.A.; DEMUNER, A.J.; ALVARENGA; E.S., SILVA, C.M., BARRETO, R.W. Chemical characterization of volatile compounds of *Lantana camara* L. and *L. radula* Sw. and their antifungal activity. *Molecules*, 17 (10): 11447-455, 2012.
- PERINI, V.B.M.; CASTRO, H.G.; CARDOSO, D.P.; LIMA, S.O.; AGUIAR, R.W.S.; MOMENTÉ, V.G. Efeito da adubação e da luz na produção de biomassa do capim citronela. *Biosci. J.*, 27 (6): 924-31, 2011.
- RIBEIRO, A.V.; FARIAS, E.D.; SANTOS, A.A.; FILOMENO, C.A.; SANTOS, I.B.; BARBOSA, L.C.A.; PICANÇO, M.C. Selection of an essential oil from *Corymbia* and *Eucalyptus* plants against *Ascia monuste* and its selectivity to two non-target organism. *Crop Prot*, 110: 207-213, 2018.
- SANTOS, F. C. C.; VOGEL, F. S. F.; MONTEIRO, S. G. Efeito de diferentes concentrações de óleo e tintura de citronela sobre os parâmetros reprodutivos de teleóginas de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. *Semin Cienc Agrar*, 33 (3): 1141-1147, 2012.
- SANTOS, M.R.A.; INNECCO, R. Adubação orgânica e altura de corte da erva-cidreira brasileira. *Hortic. Bras.*, 22 (2): 182-185, 2004.
- SCHERER, R.; WAGNER, R.; DUARTE, M.C.T.; GODOY, H.T. Composição e atividades antioxidante e antimicrobiana dos óleos essenciais de cravo-da-índia, citronela e palmarosa. *Rev. Bras. Plantas Med.*, 11 (4): 442-449, 2009.
- SILVA, M.B.; NICOLI, A.; COSTA, A.S.V.; BRASILEIRO, B.G.; JAMAL, C.M.; SILVA, C.A.; PAULA JÚNIOR, T.J.; TEIXEIRA, H. Ação antimicrobiana de extratos de plantas medicinais sobre espécies fitopatogênicas de fungos do gênero *Colletotrichum*. *Rev. Bras. Plantas Med.*, 10 (3): 57-60, 2008.



- SILVEIRA, S.M.; JÚNIOR, A.C.; SCHEUERMANN, G.N.; SECCHI, S.V.; VERRUCK, S.; KROHN, M.; VIEIRA, C.R.W. Composição química e atividade antibacteriana dos óleos essenciais de *Cymbopogon winterianus* (citronela), *Eucalyptus paniculata* (eucalipto) e *Lavandula angustifolia* (lavanda). Ver. Inst. Adolfo Lutz, 71 (3): 471-480, 2012.
- SOARES, A.A.; CASTRO, H.G.; SANTOS, G.R.; CARDOSO, D.P.; CHAGAS JÚNIOR, A.F.; AGUIAR, R.W.S. Efeito da adubação orgânica na produção de biomassa e bioatividade do óleo essencial do capim citronela, Com. Sci., 5 (4): 427-434, 2014.
- STORCK, R.C.; DESCHAMPS, C. Teor e composição de óleo essencial de patchouli (*Pogostemon cablin* (Blanco) Benth.) após diferentes tempos de secagem em estufa e temperatura ambiente. Rev. Bras. Plantas Med., 17 (4): 570-576, 2015.
- TRONGTOKIT, Y.; RONGSRIYAM, Y.; KOMALAMISRA, N.; APIWATHNASORN, C. Comparative repellency of 38 essential oils against mosquito bites. Phytother Res, 19 (4): 303-309, 2005.
- VALADARES, S.V.; HONÓRIO, I.C.G.; CALDEIRA JÚNIOR, C.F.; VALADARES, R.V.; BARBOSA, C.K.R.; MARTINS, E.R.; FERNANDES, L.A. Adubação orgânica de calêndula (*Calendula officinalis* L.) produzida sobre grama batatais. Biotemas, 23 (3): 21-24, 2010.
- VELOSO, R.A.; CASTRO, H.G.; SANTOS, G. R.; BARBOSA, L. C. A.; CARDOSO, D.P.; SILVA, K.P. Composição e fungitoxicidade do óleo essencial de capim citronela em função da adubação orgânica. Pesq. Agropec. Bras., 47 (12): 1707-13, 2012.
- WONG, K.K.Y.; SIGNAL, F.A.; CAMPION, S.H.; MOTION, R.L. Citronella as an insect repellent in food packaging. J. Agric. Food Chem., 53 (11): 4633-636, 2005.

Avaliação físico-química e biológica de nanoemulsão contendo clotrimazol como alternativa terapêutica para o tratamento de candidíase vulvovaginal

Physicochemical and biological evaluation of clotrimazole loaded nanoemulsion as a therapeutic alternative for treatment of vulvovaginal candidiasis

SANTOS, M.M.¹; FERREIRA, K.C.B1.; SANTOS-VALLE, A.B.C.¹; DINIZ, I.O.M.²; FABRI, R.L.²; PITTELLA, F.¹; TAVARES, G.D.^{1*}

¹ Department of Pharmaceutical Sciences, Faculty of Pharmacy, Federal University of Juiz de Fora, Juiz de Fora, MG, Brasil.

² Department of Biochemistry, Institute of Biological Sciences. Federal University of Juiz de Fora, Juiz de Fora, MG, Brasil.

* **Corresponding author:** Guilherme Diniz Tavares
Rua José Lourenço Kelmer Street, Juiz de Fora, cep 36036-900, MG, Brazil.
diniztavares@gmail.com. Tel: (32) 9 98815-0508.

DOI: DOI: <https://doi.org/10.29327/226760.2.1-6>

RESUMO

A candidíase vulvovaginal é uma infecção de alta incidência, atingindo 75% das mulheres adultas. No entanto, os microrganismos desenvolvem mecanismos de proteção, e por isso, é importante o desenvolvimento de estratégias. O objetivo do presente estudo foi o desenvolvimento de formulação nanoemulsionada contendo clotrimazol (CTZ) visando o tratamento tópico da candidíase vulvovaginal. As nanoemulsões (NE-CTZ) foram preparadas pelo método de temperatura de inversão de fase e caracterizadas em relação ao diâmetro hidrodinâmico médio (DHm), índice de polidispersividade (Pdl), potencial Zeta (pZ), Eficiência de Encapsulação (EE), Espectroscopia no Infravermelho Médio (FT-MIR), morfologia, citotoxicidade em linhagem de fibroblastos (NHI/3T3) e atividade antifúngica frente às cepas de *Candida albicans* sensível (ATCC 24433) e resistente à múltiplas drogas (ATCC 10231). O DmH das nanoemulsões foi de aproximadamente 260 nm, com Pdl característico de sistemas monodispersos (~ 0.3) e pZ de -26 mV. As nanoemulsões propiciaram elevada incorporação do CTZ (EE ~ 100%) e os ensaios de FT-MIR puderam corroborar a encapsulação desse ativo. As análises morfológicas mostraram nanogotículas com tamanho semelhante ao encontrado para o DHm e com formato arredondado irregular. No ensaio de viabilidade celular foi constatado que em todas as concentrações testadas (4,8-0,15µg/mL) a nanoemulsão demonstrou menor potencial citotóxico quando comparada ao fármaco livre. Em relação aos ensaios antifúngicos, a NE-CTZ apresentou atividade inibitória frente às cepas testadas na faixa de concentração de 4,8- 0,6µg/mL (referente ao CTZ). Pelo exposto, a formulação desenvolvida apresenta características físico-químicas e biológicas promissoras para utilização no tratamento da candidíase vulvovaginal, sobretudo nos casos de resistência antifúngica a outros fármacos azólicos.

Palavras-chave: nanoemulsão, clotrimazol, candidíase vulvovaginal.

ABSTRACT

Vulvovaginal candidiasis is a high incidence infection, affecting 75% of adult women. However, microorganisms develop protective mechanisms, so it is important to develop strategies. The aim of the present study was the development of clotrimazole (CTZ) loading nanoemulsion for topical treatment of vulvovaginal candidiasis. The nanoemulsions (NE-CTZ) were prepared by the phase inversion temperature method and characterized in relation to the average hydrodynamic diameter (Zav), polydispersity index (Pdl), Zeta potential (Zp), Encapsulation Efficiency (EE), Mid Infrared Spectroscopy (FT-MIR), morphology, cytotoxicity in fibroblast cell line (NHI/3T3) and antifungal activity against susceptible (ATCC 24433) and multidrug resistant (ATCC 10231) strains of *Candida albicans*. The Zav of nanoemulsions was approximately 260 nm, with Pdl characteristic of monodisperse systems (~ 0.3) and Zp was equal to -26 mV. Nanoemulsions provided high CTZ incorporation (EE ~ 100%) and FT-MIR assays could corroborate the encapsulation of this active. Morphological



analysis showed droplets similar in size to those found for Zav and with irregular round shape. In the cell viability assay it was found that for all concentrations tested (4.8- 0.15 μ g/ mL) nanoemulsion showed lower cytotoxic potential when compared to free drug. Regarding antifungal assays, NE-CTZ showed inhibitory activity against strains tested in the concentration range of 4.8-0.6 μ g/ mL (referring to CTZ). Therefore, the developed formulation presents promising physicochemical and biological characteristics for use in the treatment of vulvovaginal candidiasis, specially in cases of antifungal resistance to other azole drugs.

Keywords: nanoemulsion, clotrimazole, vulvovaginal candidiasis.

INTRODUCTION

Vulvovaginal candidiasis (VVC) is a fungal infection considered the second most common vaginal infection that affects about 70-75% of the female population of childbearing age (XU et al., 2018). It is estimated that VVC reaches 138 million women, annually, and that 372 million women are affected throughout their life by this disease (DENNING et al., 2018). Although candidiasis does not cause the patient's death, it can cause physical, psychological and sexual complications (AHANGARI et al., 2019).

Despite there are 71 types of yeast, *Candida albicans* is largely responsible for most infections (AMARAL et al., 2019). About 90% of VVC cases caused by *C. albicans* are treated with oral or topical antifungals (FARHAN et al., 2018). Oral preparations are chosen for systemic infections or immunosuppressed patients (KANG et al., 2018). Current treatment of VVC uses azole antifungals including fluconazole, miconazole, itraconazole, ketoconazole, thioconazole and clotrimazole (CALVO et al., 2018). It is important to consider that the use of azoles in the treatment or prevention of *Candida* infections has increased the occurrence of resistance of the microorganism to these antifungals, especially fluconazole (SOUZA et al., 2019). In addition, fluconazole is likely to favor adverse events such as gastrointestinal disorders, headaches, nausea and skin rash (ALSAAD et al., 2015). To overcome these drawbacks, clotrimazole may be the drug of choice for VVC therapy.

Clotrimazole has better tolerability and fewer adverse effects when compared to other azoles. This antifungal acts by inhibiting lanosterol 14- α demethylase in *C. albicans* cells. This inhibition occurs due to the binding of the unsubstituted nitrogen (N-3 or N-4) of the imidazole moiety to the ferric heme group and also by the binding of the substituted N-1 to cytochrome P450 apoprotein. Inhibition of this enzyme promotes blockage of the conversion of lanosterol to ergosterol, that alters the membrane permeability and causes the microorganism death (QUINDÓS et al., 2019).

For the treatment of vulvovaginal candidiasis, lotrimazole-containing creams are commercially available. However, the development of modified release formulations may be a therapeutic alternative for greater treatment efficacy. In this sense, the development of nanotechnology-based release systems is increasingly being explored in pharmaceutical development and research (AMARAL et al., 2019; VERMA et al., 2019). In this sense, studies shows that the use of nanostructured devices provide greater drug delivery efficiency by releasing it specifically to the target and improving its bioavailability (SOSNOWSKA et al., 2017). Therefore, sub-toxic drug concentrations can be used, which helps to reduce the development of resistance by microorganisms. In addition, nanoparticles allow a lower release of the encapsulated active, that promotes a longer action of the drug, reduced toxicity and reduced side effects, which improves the patient's life quality (JAIN, THAREJA , 2019).



Nanoemulsions are gaining prominence due to their properties that allow the incorporation of hydrophobic or hydrophilic actives. This is due to the fact that its constitution is made by two immiscible liquids (SOSNOWSKA et al., 2017). Besides that, nanoemulsions have a small droplet size, easy tissue penetration, high drug permeation rate and are easily prepared at low cost (SORIANO-RUIZ et al., 2018).

With these considerations in mind, the objective of this study was to develop and characterize nanoemulsions containing clotrimazole as a therapeutic alternative for the treatment of vulvovaginal candidiasis.

MATERIAL AND METHODS

Nanoemulsion preparation

Nanoemulsions loaded CTZ (NE-CTZ) were prepared the phase inversion temperature method. Briefly, the materials were separated into aqueous phase consisting of water (80 %) (continuous phase) and oil phase containing Caprylic/Capric Triglyceride (Miglyol®, 10%), a mixture of non-ionic surfactant (10%) [poly-sorbate 80 (TWEEN® 80, 60%) and sorbitan monostearate (SPAN® 60, 40%)] and clotrimazole (2.5 mg/mL) (dispersed phase) and heated at 75°C. Next, the aqueous phase was dripped onto the oil phase at 600 rpm and the emulsion formed was cooled in an ice bath to 25 °C under constant stirring. For comparison purposes nanoemulsion without clotrimazole (NE) was prepared by the same method.

Average hydrodynamic diameter (Zav), polydispersity index (Pdl) and Zeta potential (Zp)

The determination of the Zav as well as the Pdl was performed using the Dynamic Light Scattering (DLS) technique. Zeta potential values were determined using the electrophoretic mobility technique. Measurements were performed on Zetasizer Nano ZS90 equipment (Malvern®, Malvern, UK), at 25 °C, after di-

lution of samples (400x) in ultrapurified water. Measurements were performed in triplicate and values were expressed as mean ± standard deviation.

Encapsulation Efficiency (EE)

The EE was determined indirectly by quantifying the free drug present in the supernatant after centrifugation of NE-CTZ. Samples were centrifuged on Amicon centrifuge filters (MWCO 10.000, Millipore, Germany) at 19.000 G for 30 minutes. The filtrate was analyzed on the Nanodrop 2000 Spectrophotometer (ThermoFisher Scientific Inc., USA), after proper dilution in ethanol, at 208nm. The percentage of encapsulation efficiency (% EE) was calculated according to the following equation:

$$(I) \% EE = \frac{\text{total drug content} - \text{free drug}}{\text{total drug content}} \times 100$$

Fourier Transform Mid-Infrared Spectroscopy (FT-MIR)

FT-MIR analyzes were performed on the Perkin Elmer® SPECTRUM TWO equipment (São Paulo, Brazil) which has a zinc selenide attenuated total reflectance (ATR) enhancement with a resolution of 4 cm⁻¹. NE, NE-CTZ and pure clotrimazole were analyzed. For this, the suspended samples (20 µL) were dried at 40°C directly on the equipment. The spectrum was obtained using OPUS® Software for wavelengths in the range of 4000-550 cm⁻¹ with 16 spectrum scans (RUTZ, 2017).

Transmission Electron Microscopy

The morphological characterization of nanoemulsions was made by transmission electron microscopy (MET) at the Central Electron Microscopy Laboratory of the Federal University of Santa Catarina using the JEM-1011 (Jeol LTD., Tokyo, Japan) equipment operated at accelerating voltage of 80kV. For this, an aliquot

of the NE and NE-CTZ was placed on an amorphous carbon-coated Parlodion® 200 mesh (CF200-Ni, SEM) nickel grid and then dried for 24h at room temperature. Thus, the bright field option was selected for morphology analysis up to 50,000x magnification.

Cell viability

In a 96-well plate NIH/3T3 cells were seeded at a density of 5×10^3 cells per well with DMEM with 10% fetal bovine serum and 1% antibiotic (penicillin/streptomycin). Subsequently, the plate was incubated overnight at 37°C in 5% CO₂. NE, NE-CTZ and free drug solutions were prepared and added to the wells (n=3) at the following concentrations: 0.15, 0.3, 0.6, 1.2 and 2.4 µg/mL of CTZ. Cells with culture medium were considered negative control and treatment with 5% DMSO was considered positive control. Also, the solvent control (DMSO 0.5%, used for solubilization of CTZ) was added. The plate was incubated under the same conditions as above for 24h. After this time, 3-(4,5-Dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide (MTT) was added and the plates were incubated for 4h. The precipitate formed was dissolved with DMSO and their absorbance was measured on a Spectramax 190 (USA) spectrophotometer at 540 nm. Negative control was considered as 100% viable cells. Analysis of variance (ANOVA) was performed to test the effects of the treatments and the Tukey test was used for comparisons between the individual treatment groups using GraphPad Prism 5.0 software (GraphPad Software, Inc). p values less than 0.05 (p <0.05) were considered statistically significant.

In vitro antifungal activity

The antifungal activity of NE-CTZ was performed according CLSI (2017) in order to determine the Minimal Inhibitory Concentration (MIC). Sensitive (ATCC 24433) and multidrug resistant *C. albicans* (ATCC 10231) was cultured at 35 °C for 24 h in Sabouraud Dextrose agar

(SDA). Sample stock solution of NE, NE-CTZ and CTZ were diluted from 0.0375 to 4.8 µg/mL (final volume = 80 µl) with DMSO (final concentration ≤ 1%). After, 100 µL of Sabouraud Dextrose Broth (SDB) was added to the wells. Finally, 20 µl of 10³ CFU/mL (according to 0.5 McFarland turbidity standards) of standardized fungal suspension was inoculated in a 96-well plate and the test was performed in a volume of 200 µL. Plates were incubated at 35 °C for 24 h.

Similar tests were performed simultaneously for growth control (SDB + microorganisms + DMSO) and sterility control (SDB + DMSO). The MIC values were calculated as the highest dilution showing complete inhibition of tested strain. The analyses were performed in duplicate.

To determine the Minimum Fungicidal Concentration (MFC), samples (NE-CTZ and CTZ) from each well that showed no visible fungus growth in the MIC assay was plated on freshly prepared SDA plates and incubated at 35 °C for 24 h (CAMPOS et al., 2018).

The MFC was expressed as the concentration of the samples that did not show any growth on a new set of agar plates.

RESULTS AND DISCUSSION

Average hydrodynamic diameter (Zav), Polydispersity Index (Pdl) and Zeta potential (Zp)

The Zav, Pdl and Zp values of the NE and NE-CTZ are shown in Table 1.

Table 1 - Average hydrodynamic diameter, polydispersity index (Pdl) and zeta potential of nanoemulsions (n=3)*

	Zav (nm)	Pdl	Zp (mV)
NE	265.7 ± 1.84	0.30 ± 0.05	-26.5 ± 1.1
NE-CTZ	274.2 ± 3.50	0.32 ± 0.08	-26.0 ± 0.6

*Results are expressed as average ± standard deviation

The mean diameter value found for the nanoemulsion formulations were consistent with literature data (HASANI et al., 2015). Besides, the values for the NE-CTZ was in accordance with those indicated for topical application (50-300 nm) (COSTA et al., 2018). This size is important for nanoparticle retention at the specific site of therapeutic action, ensuring that it does not cross the deepest layers of the skin and enter the systemic circulation (GARCÊS et al., 2018). From the results found for Pdl it is possible to suggest the formation of monodisperse systems, which contributes to the stability of nanoemulsions. In this sense, scientific data report that values less than or equal to 0.3 are characteristic of nanoparticles with unimodal size distribution and low size variability (AMARAL et al., 2019).

Zeta potential indicates the surface charge of the nanoparticles and also suggests the stability of the suspension. This stability can be reached by the use of nonionic molecules, which promotes steric stability, but also from the electrical repulsion of the surface charges of each nanoparticle (JAIN, THAREJA, 2019). The values found for NE and NE-CTZ are of about -20mV. This charge promotes repulsion between the droplets and consequently, promotes the system's stability. The negative charge found may be due to ionization of fatty acids present in the oil phase.

Encapsulation Efficiency (EE)

The results of free CTZ quantification after nanoemulsion centrifugation led to EE close to 100% ($99,995\% \pm 0,005$) and may be justified due to the high solubility of clotrimazole in the oily phase of nanoemulsion, which allows most of the drug molecules to be encapsulated within the droplets. From this perspective, Souto et al (2004) used the same oil to prepare CTZ-loading nanostructured lipid carriers. Besides that, similar result was also found by Das, Ng and Tan

(2014) that developed clotrimazole-containing solid lipid nanoparticles and lipid nanocarriers with EE between 80-90%.

Fourier Transform Mid-Infrared Spectroscopy (FT-MIR)

Infrared spectrometry was used to corroborate drug encapsulation and possible nanoparticle changes. The free drug spectrum was recognized by the library of the equipment used to do the analysis (Figure 1). Peaks at 3050 and 1560 are characteristic of the clotrimazole molecule and can be attributed to the heteroatom ring (KAUR et al., 2018). The peaks around 3000 may be due to the C-H bond belonging to its aromatic ring, and the peaks around 600-800 are characteristic of clotrimazole's aromatic region. These characteristics were also reported by Patel and colleagues (2018) and Bilensoy and colleagues (2006).

By observing the nanoemulsion spectrum it is possible to verify the presence of a broad band around 3400 that can be attributed to OH bonds present in polysorbate 80 and caprylic acid molecules. The two peaks around 3000 are characteristic of C-H bonds present in all molecules used in nanoemulsion formation. Another peak found around 1700 may be characteristic of C = O bonds found in polysorbate 80, sorbitan monostearate

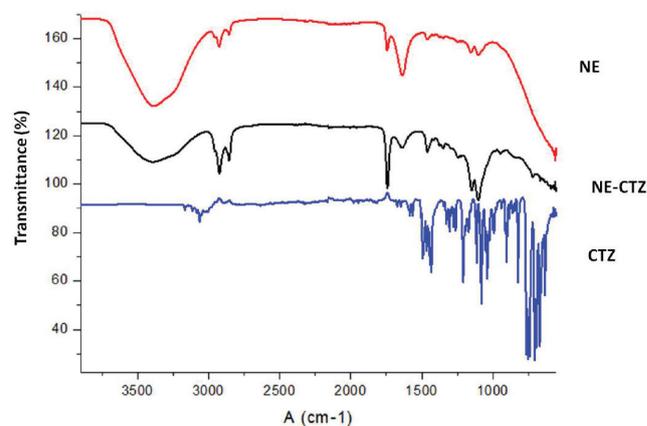


Figure 1 - FTIR spectrum of nanoemulsion with clotrimazole (black), nanoemulsion without clotrimazole (red) and free clotrimazole (blue)

and caprylic acid molecules. Beside this peak, a C = C bond can be observed and it is present in the surfactants (PAIVA et al., 2015). Regarding the NECTZ, although presenting a similar profile to the NE, it is possible to notice that some peaks are displaced or enlarged, which may suggest interactions between the nanoemulsion constituents and the CTZ. In addition, it is possible to observe that clotrimazole's aromatic region peaks at around 600 to 800 cm^{-1} have disappeared.

These data may suggest the occurrence of CTZ encapsulation in nanoemulsions, which corroborates the EE results.

Transmission Electron Microscopy (TEM)

TEM analyzes were conducted to evaluate the morphology of nanoemulsions. The images obtained (Figure 2) showed round shaped nanoparticles and can confirm the size found by the DLS technique. Compared to NE, NE-CTZ microscopy images reveal that the presence of the drug in nanoemulsions does not lead to changes in droplet morphology. This observation is similar to that observed for the Zav results and may indicate that encapsulation of CTZ, a small molecule (344.8 Da), does not increase these droplets.

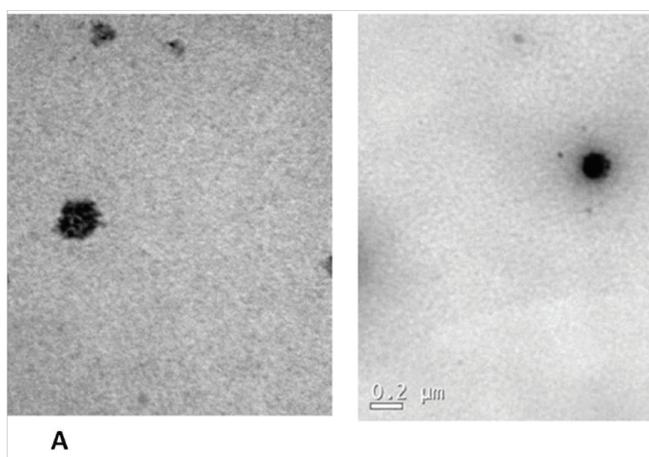


Figure 2 - NE (left) e NE-CTZ (right) - 200 nm increase.

Cell viability

The cytotoxicity evaluation of the NE, NE-CTZ and free drug and controls were evaluated using NIH/3T3 cell for 24h by the MTT assay and the results are expressed in Figure 3. As result, no significant reduction of cell viability was observed for the NC treatment at any concentration tested. Treatment with NC showed more than 95% of viable cells for all the concentrations. This reflects positively on the formulation, since it does not affect healthy cells.

When compared to the control group, treatment with free CTZ led to significantly reduced cell viability at all concentrations tested. The viability reduction was of 20%, 33%, 36% and 46% for the concentrations 0.3, 0.6, 2.4 and 4.8 $\mu\text{g}/\text{mL}$, respectively. However, the potential cytotoxic effect of the drug is minimized after its encapsulation in nanoemulsions. In this sense, at the highest concentration of CTZ (4.8 $\mu\text{g}/\text{mL}$) it was observed 56% reduction of cell viability compared to the nanoencapsulated drug. The same was observed for the remaining concentrations 0.15, 0.3, 0.6, 1.2, 2.4 $\mu\text{g}/\text{mL}$ that showed 28%, 34%, 28%, 29% and 41% reduction on viable cells compared to NE-CTZ treatments.

This difference in cell viability can be attributed primarily to the fact that the drug is protected inside the droplet, minimizing its direct action on cells. In addition, it can be an indication of a controlled CTZ release profile. Results of low cytotoxicity by nanoparticles were also found by Martinez-Perez (2017) in which the polymeric nanoparticles of poly(lactic-co-glycolic acid) and chitosan protected the cells from the clotrimazole action, presenting a cell viability greater than 75%. This finding corroborates one of the basic premises of nanotechnology: the potential for reducing possible toxic effects of drug molecules and may suggest that the system developed is a promising alternative for CTZ delivery.

In vitro antifungal activity

Resistance to azole antifungals is a major public health problem as the number of clinical infections caused by resistant *C. albicans* has increased considerably worldwide (CAMPOS et al., 2018). Azole antifungals, especially fluconazole, are the most prevalent drugs in clinical practice for treating vulvovaginal candidiasis. However, this treatment has been shown to be inefficient due to the increase in resistant strains (CHEN et al., 2010). Thus, the search for therapeutic alternatives is imperative. In this sense, this study aimed to evaluate the possibility of using nanostructured CTZ to increase antifungal efficacy, especially in cases of multidrug resistant *C. albicans* strains.

The results of *in vitro* antifungal activity show that NE-CTZ showed a MIC value of 0.6 µg / mL for both

strains tested. In contrast, the MIC for the free drug was > 0.075 µg /mL.

This may be due to the fact that free drug is already available for use, and suggests that nanoemulsion release CTZ slowly and prolongedly. Otherwise, Soriano-Ruiz et al. (2018) observed that MIC values of NE-CTZ were lower than free CLT in solution. This discrepancy may be due the difference between the oil phases used in the preparation of the formulations.

In this sense, it is possible that the oil used in our study provides a more gradual release of the active.

In addition, it can be verified that the treatment with NE did not present inhibition of *C. albicans* strains, as observed by Soriano-Riz et al. (2018). This is because its constitution does not have any asset that could confer antimicrobial activity. Also, the DMSO control

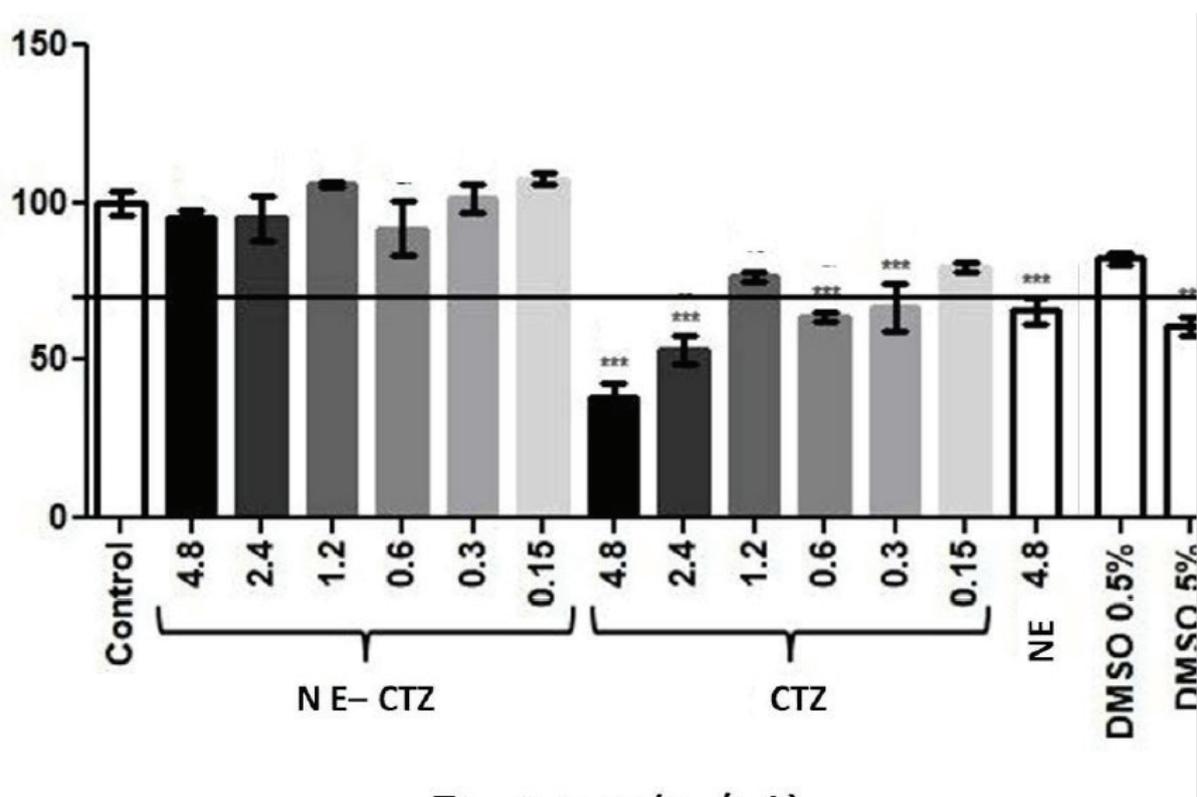


Figure 3 - Cell viability assay by MTT method on NIH/3T3 cells after 24h of treatment with CTZ, NE and NE-CTZ. Results are expressed as average of cell viability ± standard deviation.



showed no fungal growth, revealing the reliability of the test.

Finally, the Minimum Fungicidal Concentration for the NE-CTZ and CTZ were performed at concentrations of 0.6, 1.2, 2.4 and 4.8 µg/mL. All concentrations tested showed fungistatic action against sensitive and resistant *C. albicans*. This finding may indicate that nanostructuring maintains CTZ activity and thus may be a promising tool for topical treatment of vulvovaginal candidiasis.

CONCLUSION

The results presented in this work indicate that the developed nanoemulsions have satisfactory physicochemical properties, low cytotoxic potential against the studied cell line and promising *in vitro* antimicrobial activity against *C. albicans* strains. Thus, it may constitute an innovative therapeutic option for the treatment of vulvovaginal candidiasis, especially in cases of strains resistant to other azole drugs. For the continuity of the study, we are conducting *in vivo* efficacy tests and stability evaluation of semisolid formulation containing the developed nanosystem aiming to prove the potentialities of its future use.

ACKNOWLEDGMENT AND FUNDING

This work was supported by grants from Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq, Process 426601/2016-5) and Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG, Grant Number: APQ 01215-16) Scholarships were provided by Federal University of Juiz de Fora (UFJF) and Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

REFERENCES

AHANGARI, F.; FARSHBAF-KHALILI, A.; JAVADZADEH, Y.; ADIBPOUR, M.; SADEGHZADEH.; OSKOUEI, B. Comparing the effectiveness of *Salvia officinalis*, clotrimazole and their combination on vulvovaginal candidiasis: A randomized,

controlled clinical trial. *The Journal of Obstetrics and Gynaecology Research*, 45(4): 1-11, 2019.

ALSAAD, A. M. S.; KAPLAN, Y. C.; KOREN, G. Exposure to fluconazole and risk of congenital malformations in the offspring: A systematic review and meta-analysis. *Reproductive Toxicology*, 52: 78-82, 2015.

AMARAL, A. C.; SAAVEDRA, P. H. V.; SOUZA, A. C. O.; MELO, M. T.; TEDESCO, A. C.; MORAIS, P. C.; FELIPE, M. S. S.; BOCCA, A. L. Miconazole loaded chitosan-based nanoparticles for local treatment of vulvovaginal candidiasis fungal infections. *Colloids Surfaces B Biointerfaces*, 174: 409-415, 2019.

BILENSOY, E.; ROUF, M.A.; VURAL, I.; ŞEN, M.; HINCALL, A.A. Mucoadhesive, Thermosensitive, Prolonged-Release Vaginal Gel for Clotrimazole:β-Cyclodextrin Complex. *AAPS PharmSciTech*, 7(2): E1-E7, 2006.

CALVO, N. L.; SVETAZ, L. A.; ALVAREZ, V. A.; QUIROGA, A. D.; LAMAS, M. C.; LEONARDI, D. Chitosan-Hydroxypropyl Methylcellulose Tioconazole Films: A Promising Alternative Dosage Form for the Treatment of Vaginal Candidiasis. *Elsevier B.V*, 556: 181-191, 2018.

CAMPOS, L. M.; DE MELO, L.; LEMOS, A. S. O.; GUEDES, M. C. M. R.; SILVA, T. P., FIGUEIREDO, G. F.; REIS JUNIOR, J. L.; ROCHAD, V. N.; MELO, R.C.N.; ARAÚJO, M.G.F.; APOLÔNIO, A.C.M.; SCIOA, E.; FABRI, R. L. *Mitracarpus frigidus*: A promising antifungal in the treatment of vulvovaginal candidiasis. *Industrial Crops and Products*, 123: 731-739, 2018.

COSTA, A. F.; ARAUJO, D. E.; CABRAL, S.; BRITO, I. T.; LEITE, L. B. M.; PEREIRA, M.; AMARAL, A. C. Development, characterization, and *in vitro-in vivo* evaluation of polymeric nanoparticles containing miconazole and farnesol for treatment of vulvovaginal candidiasis. *Medical Mycology*, 57: 1, 52-62, 2018. CLSI, Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. CLSI Document M27, 4th ed, 2017.

CHEN, L.M.; XU, Y.H.; ZHOU, C.L.; ZHAO, J.; LI, C.Y.; WANG, R. Overexpression of CDR1 and CDR2 genes plays an important role in fluconazole resistance in *Candida albicans* with G487T and T916C mutations. *The Journal of International Medical Research*, 38(2):536-545, 2010.

DAS, S.; NG, W. K.; TAN, R.B.H. Sucrose ester stabilized solid lipid nanoparticles and nanostructured lipid carriers: II. Evaluation of the imidazole antifungal drug-loaded nanoparticle dispersions and their gel formulations. *Nanotechnology*, 25: 1-11, 2014.

DENNING, D.; KNEALE, M.; SOBEL, J. D.; RAUTEMAA-RICHARDSON, R. Global burden of recurrent vulvovaginal can-



- didiasis: a systematic review. *The Lancet Infectious Diseases*, 1-9, 2018.
- FARHAN, M. A.; MOHARRAM, A. M.; SALAH, T.; SHAABAN, O. M. Original Article Types of yeasts that cause vulvovaginal candidiasis in chronic users of corticosteroids. *Medical Mycology*, 57(6): 1-7, 2018.
- GARCÊS, A.; AMARAL, M. H.; LOBO, J. M. S.; SILVA, A. C. European Journal of Pharmaceutical Sciences Formulations based on solid lipid nanoparticles (SLN) and nanostructured lipid carriers (NLC) for cutaneous use : A review. *European Journal of of Pharmaceutical Sciences*, 112: 159-167, 2018.
- HASANI, F.; PEZESHKI, A.; HAMISHEHKAR, H. Effect of surfactant and oil type on size droplets of betacarotene-bearing nanoemulsions. *International Journal of Current Mycobiology and Applied Science*, 4(9): 146-155, 2015.
- JAIN, A. K.; THAREJA, S. Pharmaceutical nanocarriers used for drug delivery. *Artificial Cells, Nanomedicine, and Biotechnology*, 47 (1): 524-539, 2019.
- KANG, C. H.; KIM, Y. G.; HAN, S. H.; KIM, J. S.; PAEK, N. S.; SO, J. S. *In vitro* probiotic properties of vaginal *Lactobacillus fermentum* MG901 and *Lactobacillus plantarum* MG989 against *Candida albicans*. *European Journal of Obstetrics & Gynecology*, 1-20, 2018.
- KAUR, A.; JYOTI, K.; BALDIC, A.; JAIN, U. K.; CHANDRAD, R.; MADAN, J. Selfassembled nanomicelles of amphiphilic clotrimazole glycyl-glycine analogue augmented drug delivery, apoptosis and restrained melanoma tumour progression. *Materials Science & Engineering*, 89: 75-86, 2018.
- MARTINEZ-PEREZ, B.; QUINTANAR-GUERRERO, D.; TAPIA-TAPIA, M.; CISNEROS-TAMAYO, R.; ZAMBRANO-ZARAGOZA, M. L.; ALCALÁ-ALCALÁ, S.; MENDOZA-MUNOZ, N.; SINON-SEGUNDO, E. Controlled-release biodegradable nanoparticles: From preparation to vaginal applications. *Pharmaceutical Sciences*, 115:185-195, 2017.
- CAMPOS, L. M.; DE MELO, L.; LEMOS, A.S.O.; GUEDES, M. C.M.R.; SILVA, T. P.; FIGUEIREDO, G. F.; REIS, J. L.; ROCHA, V. N.; MELO, R.C.N.; ARAÚJO, M. G.F.; APOLÔNIO, A.C.M.; SCIO, E.; FABRI, R. L. *Mitracarpus frigidus* : A promising antifungal in the treatment of vulvovaginal candidiasis. *Industrial Crops and Products*, 123: 731-739, 2018.
- PAIVA, D.; LAMPMAN, G.; KRIZ, G.; VYVYAN, J. *Introducion to Spetroscopy*. Cengage Learning Edition. 2015.
- PATEL, V. P.; DAM;ASIYA, H. M.; KAPUPARA, P.; ASHARA, K. C. Temperaturedependent in situ gel of clotrimazole: na experimental study. *Folia Medica*, 61(2): 266-267, 2018.
- QUINDÓS, G.; GIL-ALONSO, S.; JAUREGIZAR, N.; ERASO, E. Therapeutic tools for oral candidiasis : Current and new antifungal drugs. *Oral surgery, oral medicine, and oral pathology*, 24(2): 72-80, 2019.
- RUTZ, J. K.; BORGES, C. D.; ZAMBIAZI, R. C.; CRIZEL-CARDOSO, M. M.; KUCK, L. S.; NOREÑA, C. P. Z. Microencapsulation of palm oil by complex coacervation for application in food systems. *Food Chemistry*, 220:59-66, 2017.
- SORIANO-RUIZ, J. L.; CALPENA-CAPMANY, A. C.; CAÑADAS-ENRICH, C.; FEBRER, N. B.; SUNER-CARBÓ, J.; SOUTO, E. B.; CLARES-NAVEROS, B. C. Biopharmaceutical profile of a clotrimazole nanoemulsion: Evaluation on skin and mucosae as anticandidal agent. *International Journal of Pharmaceutics*, 10(554): 105-115, 2018.
- SOSNOWSKA, K.; SKA, E.S.; WINNICKA, K. Nanoemulsion with clotrimazole ñ design and optimization of mean droplet size using microfluidization technique. *Acta Pol Pharmaceutica Drug Research*, 74(2): 519-526, 2017.
- SOUTO, E.B.; WISSING, S.A.; BARBOSA, C.M.; MÜLLER, R.H. Development of a controlled release formulation based on SLN and NLC for topical clotrimazole delivery. *International Journal of Pharmaceutics*, 278:71-77, 2004.
- SOUZA, J.A.; ALVES, M.M.; BARBOSA, D.B.; LOPES, M.M.; PINTO, E.; FIGUEIRAL, M.H.; DELBEM, A.C.; MIRA, N.P.J. Study of the activity of Punica granatum-mediated silver nanoparticles against *Candida albicans* and *Candida glabrata*, alone or in combination with azoles or polyenes, *Medical Mycology*, 0: 1-4, 2019.
- VERMA, S. K.; KUMAR, A.; GANTAIT, S., KUMAR, V., GUREL, E. Science of the Total Environment Applications of carbon nanomaterials in the plant system : A perspective view on the pros and cons. *The Science of the Total Environment*, 667: 485-499, 2019.
- XU, H.; ZHANG, T.; ZENG, X.; ZHANG, Y.; AN, R.; XUE, Y. Risk Factors of Vulvovaginal Candidiasis among Women of Reproductive Age in Xi'an: A Cross-Sectional Study. *BioMed Research International*, 1-8, 2018.



Rua Urucuia, 48 - Floresta
Belo Horizonte/MG | CEP: 30150-060

www.crfmg.org.br
