

ESTABILIDADE E ATIVIDADE ANTIFÚNGICA DE NANOEMULSÃO CONTENDO ÓLEO DE GERÂNIO INCORPORADA EM HIDROGEL¹

STABILITY AND ANTIFUNGAL ACTIVITY OF NANOEMULSIONS CONTAINING GERANIUM OIL INCORPORATED INTO HYDROGEL

Ian da Silva Patias², Viviane Pedroso Fausto³, Shayenne Scheffer Homrich³, Rodrigo de Almeida Vaucher⁴, Virginia Cielo Rech⁴ e Janice Luehring Giongo⁵

RESUMO

O óleo de gerânio possui como constituintes majoritários o citronelol e geraniol, responsáveis por possíveis atividades antibacterianas e antifúngicas. O objetivo deste estudo foi desenvolver um hidrogel contendo nanoemulsão de óleo de gerânio (HNEG) e verificar sua estabilidade acelerada e atividade antifúngica frente a espécies de *Candida spp.* Foram realizados testes de estabilidade acelerada em diferentes condições do HNEG, sendo avaliados a viscosidade, pH e atividade antifúngica. Os resultados demonstraram inicialmente que a nanoemulsão de gerânio (NEG) apresentou um tamanho de partícula de 160 nm, índice de polidispersão de 0,149, potencial zeta de -10 mV e pH de 5,5. Nos testes de estabilidade acelerada verificou-se que os HNEG permaneceram estáveis quando submetidos às temperaturas de 4°C e 25°C. Evidenciou-se que a HNEG apresentou atividade antifúngica similar à observada para a NEG para as espécies de *Candida albicans*, *Candida glabrata* e *Candida tropicalis*.

Palavras-chave: *Pelargonium graveolens*; estabilidade; *Candida spp.*; nanotecnologia.

ABSTRACT

The major constituents of geranium oil (Pelargonium graveolens) are citronellol and geraniol, which are responsible for possible antibacterial and antifungal activities. The objective of this study was to develop a hydrogel containing nanoemulsions of geranium oil (HNEG) and check its accelerated stability and antifungal activity against Candida species. Accelerated stability tests were performed in different conditions of HNEG, being the following criteria evaluated: viscosity, pH and antifungal activity. The results revealed that initially these nanoemulsions containing geranium oil (NEG) showed particle size of 160 nm, polydispersity index of 0.149, zeta potential of -10 mV and pH of 5.5. In accelerated stability tests, it was found that the HNEG levels remained stable when subjected to temperatures of 4°C and 25°C. It was also noticed that HNEG showed an antifungal activity similar to the one observed in NEG for species of Candida albicans, Candida glabrata and Candida tropicalis.

Keywords: *Pelargonium graveolens*; stability; *Candida spp.*; nanotechnology.

¹ Trabalho de Iniciação Científica.

² Acadêmico do Curso de Farmácia - Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões (URI) - Campus Santiago. E-mail: ianpatias@gmail.com

³ Alunas de mestrado do Programa de Pós-graduação em Nanociências - Centro Universitário Franciscano. E-mails: vivi.pfausto@gmail.com; shayscheffer@yahoo.com.br

⁴ Colaboradores. Docentes do Curso de Biomedicina e do Programa de Pós-graduação em Nanociências - Centro Universitário Franciscano. E-mails: rodvaucher@hotmail.com; vga.cielo@gmail.com

⁵ Orientadora. Docente do Curso de Farmácia - Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões (URI) - Campus Santiago. E-mail: janicegiongo@hotmail.com

INTRODUÇÃO

As infecções causadas por espécies de *Candida* tornaram-se cada vez mais frequentes em nosso meio, e o aumento da resistência a antifúngicos alerta para a necessidade da produção de métodos alternativos eficazes e capazes de controlar esse fungo oportunista. Os fármacos antifúngicos disponíveis no mercado, além de ocasionarem efeitos secundários indesejáveis, demonstram ser ineficazes para o tratamento de novos fungos ou conduzir ao surgimento rápido de resistência (GRAYBILL, 1988; LAW et al., 1994; VANDEN BOSSCHE et al., 1994).

Diante disso, inúmeras pesquisas estão sendo realizadas com o objetivo de aumentar o conhecimento sobre as atividades biológicas de óleos essenciais. Estes são compostos complexos, detentores de diversas propriedades, a destacar: atividade anti-inflamatória, antimicrobiana, antiviral, larvicida, relaxante e vermífuga (HALCON; MILKUS, 2004; LIMA et al., 2006). O óleo de *Pelargonium graveolens*, mais conhecido como óleo de gerânio, é atóxico, não irritante, geralmente não sensibilizante e possuidor de um forte efeito antimicrobiano, devido a seus compostos majoritários, o citronelol e o geraniol. Alguns estudos já demonstraram sua atividade antifúngica (GIONGO et al., 2015) e devido a isso, o óleo de gerânio torna-se uma alternativa de extrema significância contra as espécies mais isoladas de *Candida* em nosso meio: *Candida albicans*, *Candida tropicalis* e *Candida glabrata* (LIS-BALCHIN; PETER, 2004; PASSOS et al., 2005; SHAWL et al., 2006; VERMA et al., 2011).

As nanoemulsões se apresentam como uma ótima escolha para inclusão de compostos ativos (CORRÊA et al., 2005). Ademais, podem ser utilizadas em todas as vias de administração e mostram-se bastante vantajosas para aplicação tópica, apresentando baixa irritabilidade e alta penetração de fármacos e ativos, principalmente, com características lipofílicas (devido à sua similaridade aos tecidos naturais) (MOU et al., 2008; PEPPAS et al., 2000).

Neste contexto, o desenvolvimento de nanoemulsão contendo óleo de gerânio aparece como uma estratégia e sua incorporação em hidrogel torna-se interessante. Estes sistemas são mais eficientes para aplicação tópica, já que apresentam um elevado teor de água, não deixando aspecto gorduroso sobre a pele e facilitando a aceitação por parte do usuário. Com relação aos fatos mencionados, o objetivo deste estudo foi desenvolver um hidrogel contendo nanoemulsão de óleo de gerânio e verificar sua atividade antifúngica frente a espécies de *Candida*.

MATERIAL E MÉTODOS

AQUISIÇÃO E ANÁLISE DO ÓLEO DE GERÂNIO

O óleo de gerânio (GO) foi oriundo da Sigma-Aldrich Co (São Paulo, Brasil), bem como o Tween 80[®] e Span 80[®]. O Carbopol[®] foi adquirido da empresa Henrifarma. As análises do GO

foram realizadas por GC-MS em um Sistema XL GC-MS Agilent Technologies Autosystem, operando no modo EI a 70 eV, equipado com um injetor de separação/splitless (250°C). A temperatura da linha de transferência foi de 280°C. Hélio foi usado como gás de arraste a uma taxa de fluxo de 1,5 ml/min. As colunas capilares utilizadas foram a 5MS HP (30m x 0,25 mm; espessura do filme 0,25 milímetros) e a Innowax HP (30 m x 0,32 id, espessura do filme 0,50 mm). O programa de temperatura foi o mesmo que o utilizado para as análises de Cromatografia Gasosa (CG). O volume injetado foi de 1 µl de óleo de gerânio.

PREPARAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DA NANOEMULSÃO

Nanoemulsões contendo óleo de gerânio (NEG) foram obtidas após a inversão da fase orgânica (5% de óleo de gerânio e 2% de Tween[®] e acetona) na fase aquosa (2% Span 80[®] e água purificada) sob agitação. Após, foi utilizado o rota-evaporador para a retirada do solvente. A nanoemulsão, contendo óleo de gerânio, foi chamada de NEG. Como controle, foram realizadas nanoemulsões sem o óleo de gerânio (NEB). A caracterização das formulações foi realizada a partir da análise através de espalhamento de luz dinâmico (espectroscopia de correlação de fótons, PCS) para determinar o diâmetro médio das partículas e índice de polidispersão (PDI). As medições foram realizadas à temperatura ambiente, através da média de três repetições. O potencial zeta foi obtido através de eletroforese (Zetasizer[®] Nanoseries, Malvern Instruments). Essa determinação foi realizada após diluição de 500 vezes (v/v) das suspensões de nanoemulsões em solução de NaCl 10 mM previamente filtrada através de membrana com 0,45 µm. Os resultados foram obtidos através da média de três determinações. O pH foi avaliado através do uso do potenciômetro calibrado (DM-22, Digimed).

PREPARO DOS HIDROGÉIS

Foram desenvolvidos hidrogéis contendo as NEG, denominados HNEG. Para isso, foi utilizado 1 g de Carbopol[®], 0,3 g de metilparabeno e q.s.p das nanoemulsões. Após a homogeneização, foi adicionado o propilenoglicol, que atuou como agente umectante. A viscosidade do gel foi adquirida utilizando-se trietanolamina. O controle foi realizado através da produção de hidrogel contendo a NEB, este foi denominado HNEB. As formulações foram colocadas em embalagens (30 g) de plástico não transparente, semelhantes às usadas para comercialização dos produtos.

ESTABILIDADE ACELERADA

O teste emprega condições extremas e serve como auxiliar na determinação da estabilidade da formulação (ANVISA, 2004). Os parâmetros analisados para cada amostra foram: aspecto, caracte-

rísticas organolépticas (cor, odor), pH e viscosidade. As amostras foram armazenadas sob diferentes temperaturas ($4 \pm 2^\circ\text{C}$, $25 \pm 2^\circ\text{C}$ e $45 \pm 2^\circ\text{C}$) e analisadas no 1º dia, 7º dia, 15º dia, 30º dia e 60º dia.

DETERMINAÇÃO DO pH

Este ensaio foi realizado através do pHmetro modelo mPA - 210, inserindo o eletrodo diretamente na diluição aquosa 1:10 das amostras. As leituras foram realizadas em triplicatas para cada amostra estudada.

VISCOSIDADE

As determinações foram realizadas a partir de um viscosímetro rotacional Brookfield viscometer modelo RVDV - I Prime, série número 8543360, *spindle* 16. Foi utilizado 5 g de cada amostra, tendo como princípio a velocidade de rotação de eixos imersos na amostra. Os valores de velocidades de rotação do *spindle* empregados foram: 0,5, 1,0, 2,0, 2,5, 4,0, 5,0, 6,0, 10, 20, 50, 100 rpm. As amostras, em diferentes condições de armazenamento foram analisadas e os resultados corresponderam à média de três determinações.

INATIVAÇÃO DO CONSERVANTE NAS FORMULAÇÕES

Para a realização dos ensaios de atividade antifúngica foi necessário efetuar a inativação do sistema conservante, pois os constituintes da formulação podem interferir na difusão do ativo na placa. Em cada uma das formulações adicionou-se polissorbatato 80 a 1%, pois as mesmas continham o conservante metilparabeno. A inibição do conservante é fundamental para que este não atue sobre o microrganismo.

DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIFÚNGICA DOS HNEG

Em placas contendo o meio ágar Muller Hinton enriquecido com 10% de glicose, foram semeadas de maneira uniforme *Candida tropicalis* ATCC 66029, *Candida albicans* ATCC 14053 e *Candida glabrata* ATCC 66032 segundo preconizado pelo protocolo M44-A2 do CLSI (2008) com modificações.

Suspensões foram previamente preparadas com turvação de 0,5 na escala McFarland para cada espécie de *Candida*. Foram confeccionados orifícios em cada placa com a parte traseira de ponteiros estéreis. O centro foi retirado, de forma que ficou aparente um orifício e os locais foram preenchidos com as amostras com o auxílio de uma seringa estéril sem agulha da marca BD®. Em cada orifício foi adicionado 0,2 ml (0,2 g) do GO, NEG e HNEG, bem como os respectivos controles, DMSO, NEB e HNEB. Como controle positivo utilizou-se discos de anfotericina B de 50 µg.

As placas foram incubadas em estufa (Olidef CZ[®]) hermeticamente fechadas e mantidas a 37°C por 24 horas. Transcorrido esse período, foi realizada a leitura dos halos de inibição das placas em milímetros.

ANÁLISE ESTATÍSTICA

Todos os testes foram executados em triplicata e os resultados apresentados como o valor da média \pm desvio padrão. A análise estatística dos dados foi realizada com ANOVA de uma via seguida pelo teste de Tukey. Os resultados foram considerados significativos quando $p < 0,05$.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

As substâncias derivadas de plantas podem ser usadas para o tratamento de uma gama de doenças, porém esse potencial para criação de novos fármacos ainda é pouco explorado. Rates (2001) afirma que apenas uma pequena parcela de plantas tem seus componentes farmacológicos estudados. Portanto, torna-se fundamental a pesquisa por componentes com potencial terapêutico.

Dentro dessa concepção, os óleos essenciais acabam sendo escolhidos por apresentar propriedades farmacológicas fundamentais como, antifúngica, antibacteriana e anti-helmíntica (BAKKALI et al., 2008; BARROS et al., 2010; SOUZA et al., 2008).

CARACTERIZAÇÃO DO ÓLEO

O óleo de Gerânio (GO) foi caracterizado por CG-MS e os constituintes majoritários encontram-se representados na tabela 1. Os constituintes majoritários do GO foram o citronelol (17,75%) e o geraniol (14,73%). Sabe-se que a composição química dos óleos essenciais depende de vários fatores, incluindo as condições climáticas, a localização geográfica e a fertilidade do solo do local de cultivo das plantas (OLADIMEJI, 2001).

CARACTERIZAÇÃO DAS NANOEMULSÕES

As nanoemulsões preparadas foram avaliadas quanto as suas propriedades físico-químicas. A caracterização das nanoemulsões foi realizada em triplicata e os resultados são apresentados na tabela 2. A nanoemulsão contendo óleo de gerânio (NEG) mostrou diâmetro de partícula de cerca de 160 nm. Os valores encontrados para o índice de polidispersão indicam que NEG tem uma melhor distribuição das gotas, porque o valor foi de 0,149. Tanto a NEG quanto a NEB apresentaram características nanométricas.

Tabela 1 - Composição química do óleo de gerânio.

Componente	% (relativa)	R _t
Linalool	0.727	6.773
cis-Rose oxide	0.678	6.913
cis Rose oxide	0.335	7.103
α -Citronellal	0.104	7.328
Isomenthone	2.118	7.459
Menthone	2.478	7.561
L-(-)-Menthol	0.119	7.801
Citronellol	17.747	8.065
cis-Citral	0.381	8.223
Geraniol	14.73	8.309
Isogeraniol	0.138	8.418
Citronellyl formate	5.966	8.512
Geraniol formate	3.825	8.757
cis Rose oxide	0.241	9.093
(6E)-2,6-Dimethyl-2,6-octadiene	0.563	9.208
α -Cubebene	0.155	9.332
(+)-Ledene	0.634	10.669
Citronellyl butyrate	0.628	10.749
(-)- α -Cadinene	0.978	10.833
(-)-Calamenene	0.576	10.883
Cubenol	0.55	11.675
10- <i>epi</i> - γ -Eudesmol	9.519	11.775
Cubenol	1.169	11.851
2-(3-Isopropyl-4-methyl-pent-3-en-1-ynyl)- 2-methyl-cyclobutanone	0.561	11.901
γ -Eudesmol	0.389	11.935

% relativa > 0.05%, R_t (tempo de retenção) (min)

Tabela 2 - Propriedades físico-químicas das nanoemulsões do óleo de gerânio.

Formulação	Diâmetro da partícula (nm)	Índice de polidispersão	Potencial Zeta (mV)	pH
NEG	160 \pm 0,025	0,149 \pm 0,009	- 10,0 \pm 0,02	5,5 \pm 0,03
NEB	130 + 2,2	0,12 \pm 0,03	- 10,0 \pm 0,03	6,2 \pm 0,2

Formulações nanoestruturadas com tamanho igual ou inferior a 200 nm apresentam-se cineticamente mais estáveis, tendo sua separação de fases dificultada pelo movimento Browniano do sistema, capaz de exceder a taxa de segregação induzida pela gravidade (ANTON; VANDAMME, 2011). O tamanho médio obtido, ainda, é um fator extremamente importante que garante a incorporação de princípios ativos em concentrações reduzidas permitindo um aumento da interação com as matrizes, garantindo tanto uma liberação controlada como uma atividade máxima (WEISS et al., 2006; CHOI et al., 2009).

O potencial zeta é uma medida da grandeza da atração ou repulsão eletrostática ou das cargas entre partículas, fator primordial que deve ser levado em conta para que haja uma estabilidade adequada da formulação. Os valores obtidos nas NEG e NEB (-10mV) permitem afirmar que a carga eletrostática da formulação está relacionada à concentração dos tensoativos utilizados. Potenciais zeta negativos, como o obtido na NEG, podem ser consequência da utilização de tensoativos não-iônicos e são totalmente plausíveis e predisponentes de uma estabilidade satisfatória (HSU; NACU, 2003).

PRODUÇÃO DOS HIDROGÉIS CONTENDO NEG

Os HNEG apresentaram-se estáveis logo após o preparo. Foi observada uma coloração levemente leitosa para formulação e o odor apresentado foi característico ao óleo de gerânio.

ESTABILIDADE ACELERADA DOS HIDROGÉIS CONTENDO NEG

Características organolépticas

A análise das características organolépticas foi realizada de maneira subjetiva, através da confrontação entre amostras as quais foram submetidas a diferentes condições. Para a avaliação destas características, observaram-se os níveis de alteração e estes foram classificados da seguinte forma: (1) normal, sem alteração; (2) levemente separado, levemente precipitado ou levemente turvo e (3) separado, precipitado ou turvo.

Na tabela 3 estão representados os resultados obtidos em relação à aparência dos HNEG quando submetidos às diferentes temperaturas. Sua aparência permaneceu inalterada durante quase todo o período do ensaio, no entanto, a partir do sexagésimo dia foi possível observar, nas amostras armazenadas em estufa, que houve formação de grumos. Não se observou separação de fases ou componentes, nem formação de precipitados.

Tabela 3 - Avaliação da aparência do hidrogel contendo a nanoemulsão com óleo de gerânio (HNEG).

Tempo (dias)	Temperatura								
	4 ± 2 °C			25 ± 2 °C			45 ± 2 °C		
Amostras	I	II	III	I	II	III	I	II	III
0	1	1	1	1	1	1	1	1	1
7	1	1	1	1	1	1	1	1	1
14	1	1	1	1	1	1	1	1	1
30	1	1	1	1	1	1	1	1	1
60	1	1	1	1	1	1	2	2	2

1 - normal, sem alteração; 2 - levemente separado, levemente precipitado ou levemente turvo; 3 - separado, precipitado ou turvo

A tabela 4 demonstra os resultados obtidos em relação à cor dos HNEG quando submetidos às diferentes temperaturas. É possível observar que a partir do décimo quarto dia as amostras armazenadas em estufa sofreram alterações, adquirindo coloração amarelo-clara. Não foram observadas em nenhuma outra amostra, quaisquer modificações pertinentes.

Tabela 4 - Avaliação da cor do hidrogel contendo a nanoemulsão com óleo de gerânio (HNEG).

Tempo (dias)	Temperatura								
	4 ± 2 °C			25 ± 2 °C			45 ± 2 °C		
Amostras	I	II	III	I	II	III	I	II	III
0	1	1	1	1	1	1	1	1	1
7	1	1	1	1	1	1	1	1	1
14	1	1	1	1	1	1	2	2	2
30	1	1	1	1	1	1	2	2	2
60	1	1	1	1	1	1	2	2	2

1 - normal, sem alteração; 2 - levemente separado, levemente precipitado ou levemente turvo; 3 - separado, precipitado ou turvo

O HNEG mantido nas três temperaturas não demonstrou nenhuma alteração significativa no odor (rancificação), permanecendo estável e mantendo o aroma característico do óleo de gerânio em todas as amostras testadas, nas diferentes condições, por exatos 60 dias (Tabela 5).

Tabela 5 - Avaliação do odor do hidrogel contendo a nanoemulsão com óleo de gerânio (HNEG).

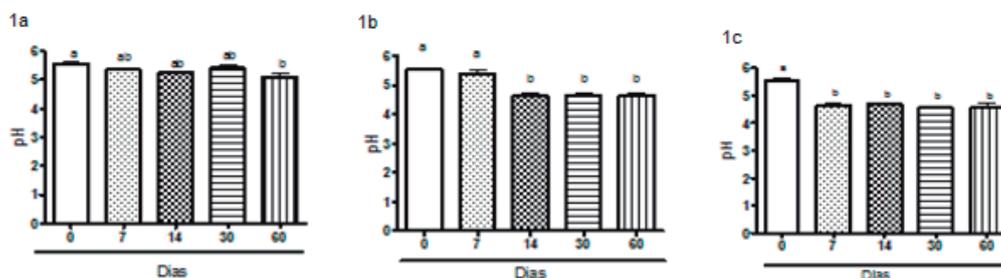
Tempo (dias)	Temperatura								
	4 ± 2 °C			25 ± 2 °C			45 ± 2 °C		
Amostras	I	II	III	I	II	III	I	II	III
0	1	1	1	1	1	1	1	1	1
7	1	1	1	1	1	1	1	1	1
14	1	1	1	1	1	1	1	1	1
30	1	1	1	1	1	1	1	1	1
60	1	1	1	1	1	1	1	1	1

1 - normal, sem alteração; 2 - levemente separado, levemente precipitado ou levemente turvo; 3 - separado, precipitado ou turvo

pH

As formulações foram avaliadas ao longo de 60 dias. Os resultados para o pH dos HNEG são apresentados conforme a figura 1.

Figura 1 - pH dos hidrogéis contendo a nanoemulsão com óleo de gerânio (HNEG) submetidos a $4 \pm 2^\circ\text{C}$ (1a), $25 \pm 2^\circ\text{C}$ (1b) e $45 \pm 2^\circ\text{C}$ (1c) nos dias de teste. Diferenças significativas são observadas quando $p < 0,05$. Letras iguais indicam que não houve diferença significativa no pH entre os dias de teste.



Na figura 1a, observa-se que quando as formulações foram submetidas à temperatura de $4 \pm 2^\circ\text{C}$ o pH inicial no dia 0 foi de 5,5 e houve uma variação significativa apenas após os 60 dias do teste. Este resultado indica que quando submetidas a temperaturas baixas a formulação permanece com boa estabilidade, corroborando com os resultados da avaliação das características organolépticas.

A figura 1b demonstra que quando os HNEG foram submetidos à $25 \pm 2^\circ\text{C}$, entre o primeiro e o sétimo dia, não houve diferença significativa nos valores de pH, entretanto, a partir do 14º dia, pode-se observar diferença significativa e o pH teve uma queda no seu valor, passando de 5,5 para 4,4. Este pH manteve-se até o final do teste. A figura 1c representa os resultados da análise de pH obtidos quando HNEG foram submetidos a temperatura de $45 \pm 2^\circ\text{C}$. Observa-se uma redução significativa a partir do sétimo dia de teste.

Essa alteração pode ter sido causada por processos oxidativos decorrentes tanto dos componentes da formulação como dos óleos vegetais, em consequência das condições de aquecimento em função do tempo de exposição, sendo estes últimos passíveis de sofrerem auto oxidação ao entrarem em contato com o oxigênio atmosférico ou altas temperaturas (LACHMAN et al., 2001; AULTON, 2005).

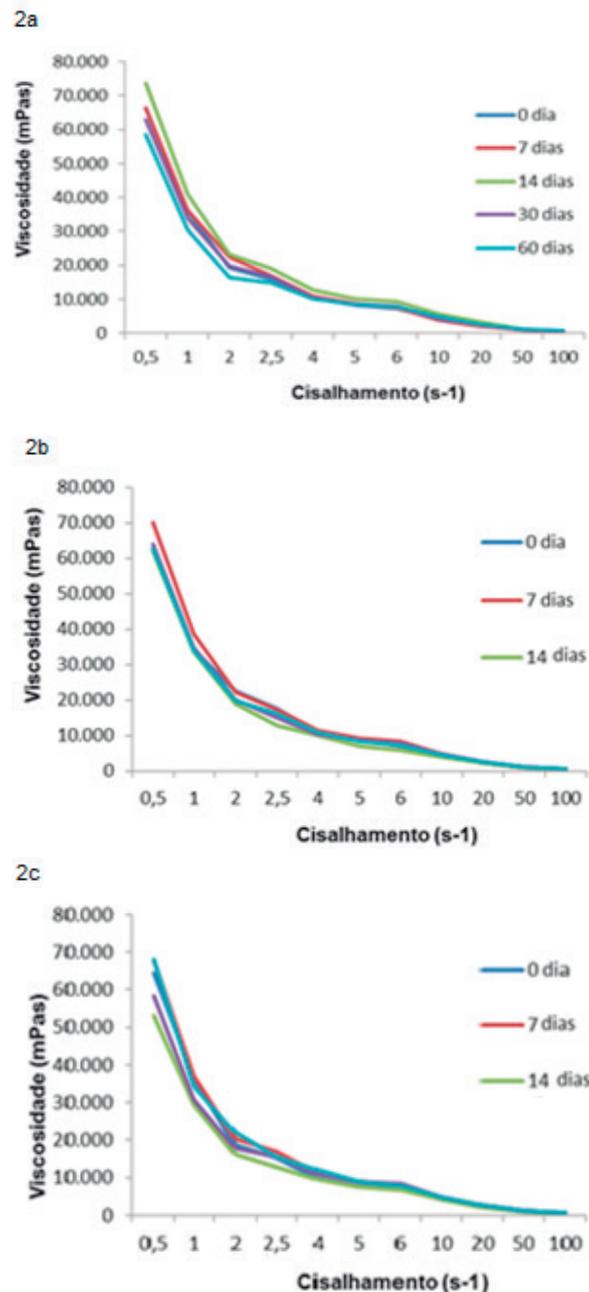
Viscosidade

A viscosidade pode ser definida como o atrito interno resultante do movimento de uma camada de fluido em relação à outra. É, em outras palavras, uma resistência ao fluxo causada pela fricção interna de um fluido (LUCAS et al., 2001). Denomina-se como cisalhamento o esforço necessário para que este fluido se movimente e, é possível afirmar que, quanto maior a viscosidade do fluido, maior é a força de cisalhamento (MONTEIRO, 2004).

O estudo consistiu na determinação da viscosidade aparente do hidrogel em função da variação da taxa de cisalhamento. Foram realizadas medições do comportamento reológico dos HNEG submetidos a diferentes temperaturas: $4 \pm 2^\circ\text{C}$ (Figura 2a), $25 \pm 2^\circ\text{C}$ (Figura 2b) e $45 \pm 2^\circ\text{C}$ (Figura 2c). A figura 2a demonstra que os HNEG armazenados na temperatura de $4 \pm 2^\circ\text{C}$ apresentaram a maior

variação de viscosidade registrada neste estudo, nos períodos em que foram postas forças de cisalhamento entre 0,5 a 4s⁻¹. No entanto, as outras medições mantiveram-se estáveis. O HNEG submetido à temperatura de 25 ± 2°C (Figura 2b) demonstra um declínio um pouco menor na sua viscosidade, apresentando-se mais estável com o decorrer do aumento das forças de cisalhamento. Por fim, na figura 2c observa-se que há uma alteração significativa na viscosidade entre as forças de 0,5 e 4s⁻¹ em relação aos dias testados. Como todos os HNEG testados, quando o *spindle* atinge a velocidade de 5 rpm, o hidrogel apresenta estabilidade no que diz respeito à sua viscosidade.

Figura 2 - Viscosidade dos hidrogéis contendo a nanoemulsão com óleo de gerânio (HNEG) submetidos a 4 ± 2°C (2a), 25 ± 2°C (2b) e 45 ± 2°C (2c) nos dias de teste.



Partindo do pressuposto de que estabilidade, neste caso, seria o momento em que o hidrogel não apresenta variações significativas em sua viscosidade, tornando-se constante com o passar do tempo (DRESSLER, 2008), podemos inferir que as amostras submetidas à temperatura ambiente apresentam a maior estabilidade entre as estudadas.

Tendo em vista os resultados obtidos, podemos enquadrar as amostras estudadas como pertencentes ao grupo de fluidos não-newtonianos pseudoplásticos. Isso quer dizer que, a tensão de cisalhamento não é diretamente proporcional à taxa de deformação e que a viscosidade diminui com o aumento da tensão (FOX; MCDONALD, 2001). Sendo assim, fluidos não-newtonianos apresentam obstáculos para a determinação de uma viscosidade bem definida.

No entanto, esse comportamento registrado é totalmente conjecturado, conforme descreveram Lionzo (2011) e Dressler (2008). Os autores observaram que, à medida que a velocidade de rotação do *spindle* aumenta, a taxa de cisalhamento gera uma viscosidade de fluxo menor que a viscosidade inicial.

A explicação para este fato é de que, quando se encontra em repouso, as cadeias poliméricas do hidrogel estão suficientemente desorganizadas, tornando o sistema mais resistente contra o fluxo. Quando submetido ao cisalhamento, estas ditas cadeias poliméricas adquirem orientação na direção do fluxo, reduzindo a resistência entre as cadeias, culminando na redução da viscosidade do sistema, conforme o aumento da velocidade do *spindle* (DRESSLER, 2008).

ATIVIDADE ANTIFÚNGICA

As atividades antifúngicas foram avaliadas seguindo instruções do protocolo M44-A2 do CLSI (2008) e pode ser observada na tabela 6. Pode-se evidenciar que a HNEG apresentou atividade antifúngica similar à observada para a NEG para as espécies de *C. albicans*, *C. glabrata* e *C. tropicalis*. Contudo, a atividade antifúngica foi mais pronunciada para o GO.

Tabela 6 - Avaliação da atividade antifúngica da NEG pura e incorporada em hidrogel.

Microrganismo	GO (mm)	NEG (mm)	HNEG(mm)	NEG (mm)	HNEB (mm)	Anf B (mm)
<i>C. tropicalis</i> ATCC 66029	12 ± 0	8 ± 1	8 ± 1,5	ND	ND	25 ± 1,06
<i>C. albicans</i> ATCC 14053	16 ± 2,43	12 ± 1	12 ± 2	ND	ND	28 ± 1,2
<i>C. glabrata</i> ATCC 66032	18 ± 2	13 ± 2	12 ± 2	ND	ND	20 ± 0,7

ND: Não detectado; GO: óleo de gerânio; NEG: Nanoemulsão contendo óleo de gerânio; HNEG: Hidrogel contendo a nanoemulsão com óleo de gerânio; HNEB: Hidrogel contendo a nanoemulsão controle; Anf B: Anfotericina B

Conforme testes recentes realizados por Viriato (2014), o citronelol apresenta comprovada atividade contra cepas de *Candida*, sendo relatada tal atividade para *Candida tropicalis*, *Candida*

albicans, *Candida dubliniensis* entre outras. Sendo o citronelol o componente majoritário do óleo de gerânio, o mesmo pode ser o responsável pela atividade antifúngica do GO, NEG e HNEG.

Recentemente, Bezerra (2015) após a administração de fitoconstituintes em cepas de *Candida albicans*, entre eles o geraniol, obteve resultados que promoveram alterações na morfologia de fungos, impedindo o desenvolvimento de pseudo-hifas, principal estrutura responsável pelo fator de virulência do fungo. Giongo et al. (2015), também demonstraram atividade antifúngica de nanocápsulas contendo GO frente a diferentes espécies de *Candida*.

É importante salientar que a metodologia do ensaio microbiológico pode influenciar nos resultados obtidos. Estudos utilizando poços apresentaram diferenças em relação à técnica de disco de papel filtro. Sabe-se que a forma de apresentação do material pode interferir no perfil de resposta (SALOMÃO et al., 2007).

Em nosso estudo realizamos a inativação do sistema conservante, para que este não interferisse em nossos resultados. É imprescindível a seleção dos adjuvantes farmacotécnicos ideais para cada substância, não somente do ponto de vista da estabilidade, custo e aparência, mas principalmente em relação a sua efetividade.

CONCLUSÃO

Este estudo objetivou a produção de um hidrogel contendo nanoemulsão de óleo de gerânio para uma possível aplicação tópica contra espécies de *Candida*. As nanoemulsões desenvolvidas apresentaram características nanométricas e quando incorporadas ao hidrogel, mantiveram-se estáveis ao longo dos 60 dias nas temperaturas de $4 \pm 2^\circ\text{C}$ e $25 \pm 2^\circ\text{C}$. A média das viscosidades obtidas nos testes nos permite afirmar que o HNEG se comporta como um fluido não-newtoniano pseudo-plástico, sendo os resultados aceitáveis e decorrentes desse tipo de fluido.

A atividade antifúngica do composto testado frente às diferentes espécies de *Candida* revelou que o HNEG apresentou similar atividade a NEG. Em virtude dos fatos mencionados conclui-se que o HNEG produzido contendo NEG apresentou resultados satisfatórios em praticamente todos os testes de estabilidade acelerada a que foram submetidos.

Isso permite afirmar que é uma formulação estável para condições normais de armazenamento e com potencial incontestável para tratamento alternativo de micoses superficiais provocadas por *Candida albicans*, *Candida glabrata* ou *Candida tropicalis*.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem o suporte financeiro da FAPERS e CNPq (Brasil).

REFERÊNCIAS

ANTON, N.; VANDAMME, T. F. Nano-emulsions and Micro-emulsions: Clarifications of the Critical Differences. **Pharmaceutical Research**, v. 28, p. 978-985, 2011.

ANVISA. **Guia de estabilidade de Produtos Cosméticos/Séries temáticas Anvisa**. Brasília: Agência Nacional de Vigilância Sanitária, v. 1, 2004, p. 1-51.

AULTON, M. E. **Delineamento de Formas Farmacêuticas**. 2. ed. São Paulo: Artmed Editora, 2005.

BAKKALI, F. et al. Biological effects of essential oils - A review. **Food and Chemical Toxicology**, v. 46, p. 446-475, 2008.

BARROS, M. B. L. et al. Esporotricose: a evolução e os desafios de uma epidemia. **Revista Panamericana de Salud Pública**, v. 27, p. 455-460, 2010.

BEZERRA, A. P. B. **Avaliação da atividade antifúngica de fitoconstituintes contra *Candida albicans***. 2015. 39f. Trabalho de Conclusão (Curso de Farmácia) - Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2015.

CHOI, A. J. et al. Effects of surfactants on the formation and stability of capsaicin-loaded nanoemulsions. Korea: **Food Science and Biotechnology**, v. 18, n. 5, p. 1161-1172, 2009.

CLSI. Method for antifungal disk diffusion susceptibility testing of yeasts. Approved guideline. Ed. 2. **M44-A2**, Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne (PA), v. 29, n. 17, 2008.

CORRÊA, N. M. et al. Avaliação do comportamento reológico de diferentes géis hidrofílicos. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, n. 41, p. 73-78, 2005.

DRESSLER, A. C. **Propriedades reológicas de compósitos sol-gel de quitosana/glicerol/nanoelementos**. 2008. 58f. Dissertação (Mestrado em Química) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2008.

FOX, R. W.; MCDONALD, A. T. **Introdução à Mecânica dos Fluidos**. 5. ed. Nova York: School of Mechanical Engineering Purdue University, 2001. p. 504.

GIONGO, J. L. et al. Antimycobacterial, antimicrobial and antifungal activities of geranium oil loaded nanocapsules. **International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**, v. 7, p. 975-1491, 2015.

GRAYBILL, J. R. The long and the short of antifungal therapy. **Infectious Disease Clinics of North America**, v. 2, p. 805-825, 1988.

HALCON, L.; MILKUS, K. *Staphylococcus aureus* and wounds: a review of tea tree oil as a promising antimicrobial. **American Journal of Infection Control**, v. 32, p. 402-408, 2004.

HSU, J.; NACU, A. Behavior of soybean oil-in-water emulsion stabilized by nonionic surfactant. Maryland Heights. **Journal of Colloids and Interface Science**, v. 259, p. 374-381, 2003.

LACHMAN, L.; LIEBERMAN, H. A.; KANIG, J. L. Teoria e prática na indústria farmacêutica. **Calouste Gulbenkian**, Lisboa, 3. ed., v. 2, p. 509-517, 2001.

LAW, D. et al. High prevalence of antifungal resistance in *Candida* spp. from patients with AIDS. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 34, p. 659-668, 1994.

LIMA, I. O. et al. Atividade antifúngica de óleos essenciais sobre espécies de *Candida*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 16, p. 197-201, 2006.

LIONZO, M. I. Z. **Influência de polieletrólitos sobre estruturas fosfolipídicas e suas aplicações**. 2011. 120f. Tese (Doutorado em Ciências dos Materiais) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2011.

LIS-BALCHIN, M.; PETER, K. V. **Geranium - In Hand Book of Herbs and Species**. London UK: Woodhead Publishing Limited, 2004.

LUCAS, E. F.; SOARES, B. G.; MONTEIRO, E. E. C. **Caracterização de Polímeros**: determinação do peso molecular e análise térmica. Rio de Janeiro: E-Papers, 2001, p. 366.

MONTEIRO, A. M. F. **Proteínas com funcionalidade mecânica**: um estudo físico-químico sobre a viscoelasticidade da gliadina, uma proteína de reserva do glúten do trigo. 2004. 174f. Tese (Doutorado em Química) - Universidade de São Paulo, São Paulo, 2004.

MOU, D. et al. Hydrogel thickened nanoemulsion system for topical delivery of lipophilic drugs. **International Journal of Pharmaceutics**, n. 353, p. 270-276, 2008.

OLADIMEJI, F. A. Effect of autoxidation on the composition and antimicrobial activity of essential oil of *Lippia multiflora*. **Pharmaceutical and Pharmacological Letters**, v. 11, n. 2, p. 64-67, 2001.

PASSOS, X. S. et al. *Candida* colonization in intensive care unit patients' urine. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 100, p. 925-928, 2005.

PEPPAS, N. A. et al. Hydrogels in pharmaceutical formulations. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, n. 50, p. 27-46, 2000.

RATES, S. M. K. Plants as source of drugs. **Toxicon**, Amsterdam, v. 39, p. 603-613, 2001.

SALOMÃO, K. et al. Brazilian Propolis: Correlation Between Chemical Composition and Antimicrobial Activity. **Oxford Journals**, v. 11, 2007.

SHAWL, A. S. et al. Cultivation of rose scented Geranium (*Pelargonium sp.*) as a cash crop in Kasmir Valley. **Asian Journal of Plant Sciences**, v. 5, p. 673-675, 2006.

SOUZA, M. M. C.; BEVILACQUA, C. M. L.; MORAIS, S. M. Anthelmintic acetogenin from *Annosa aquamosa L.* Seeds: **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 80, p. 271-277, 2008.

VANDEN BOSSCHE, H. et al. Mechanisms and clinical impact of antifungal drug resistance. **Journal of Medical and Veterinary Mycology**, v. 32, p. 189-202, 1994.

VERMA, R. K. et al. Assessing N-use efficiency, planting time and economics of fertilizer N in rose-scented geranium (*Pelargonium graveolens L' Herit*) in Western Himalayan Region of India. **African Journal of Agricultura**, v. 6, p. 553-559, 2011.

VIRIATO, A. Terpenoides com atividade antifúngica para *Candida Berkhout*, causadoras de infecções hospitalares. **O Mundo da Saúde**, São Paulo, n. 38, v. 1, p. 40-50, 2014.

WEISS, J.; TAKHISTOV, P.; McCLEMENTS, J. Functional materials in food nanotechnology. Hoboken: **Journal of Food Science**, v. 71, n. 9, p. 107-116, 2006.

