



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

CAMILA DE ALMEIDA PEREZ PIMENTA

**DESENVOLVIMENTO E AVALIAÇÃO DE DESEMPENHO DE FORMULAÇÕES
UNGUEAIS À BASE DE TERBINAFINA**

RECIFE

2022

CAMILA DE ALMEIDA PEREZ PIMENTA

**DESENVOLVIMENTO E AVALIAÇÃO DE DESEMPENHO DE FORMULAÇÕES
UNGUEAIS À BASE DE TERBINAFINA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas do Departamento de Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Orientadora: Prof^a. Dra. Leila Bastos Leal.

Co-orientadora: Prof^a Dra. Maria Begõna Delgado Charro

RECIFE

2022

Catálogo na fonte:
Bibliotecário: Aécio Oberdam, CRB4: 1895

P644d Pimenta, Camila de Almeida Perez.
Desenvolvimento e avaliação de desempenho de formulações ungueais à base de
terbinafina / Camila de Almeida Perez Pimenta – 2022.
113 p.

Orientadora: Leila Bastos Leal
Coorientadora: Maria Belgoña Delgado-Charro
Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco, Centro de
Ciências da Saúde. Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas. Recife,
2022.

Inclui referências, apêndices e anexos.

1. Onicomicose. 2. Terbinafina. 3. Unhas. 4. Tópico. 5. Ensaio in vitro. Leal, Leila
Bastos (orientadora). II. Título.

615 CDD (23.ed.)

UFPE (CCS 2023 - 250)

CAMILA DE ALMEIDA PEREZ PIMENTA

**DESENVOLVIMENTO E AVALIAÇÃO DE DESEMPENHO DE FORMULAÇÕES
UNGUEAIS À BASE DE TERBINAFINA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas do Departamento de Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas. Área de concentração de fármacos e medicamentos

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Danilo César Galindo Bedor
Universidade Federal de Pernambuco
Examinador Interno - Presidente

Dra. Maria Alice Maciel Tabosa
Massachusetts General Hospital- Harvard Medical School
Examinadora Externa

Profa. Dra. Maria Begoña Delgado Charro
University of Bath
Examinadora Externa

Profa. Dra. Danielle Cristine Almeida Silva de Santana
Universidade Federal de Pernambuco
Examinadora Interna

Dr. André Luis Menezes Carvalho
Universidade Federal do Piauí
Examinador Externo

Aprovada em: 17/06/22

AGRADECIMENTOS

Primeiro de tudo agradeço à Deus pelo amor e misericórdia. Ele me fez chegar até aqui, mesmo sem que eu acreditasse que poderia ir tão longe.

À minha família que, com todo carinho, dedico esse trabalho. Em especial meus pais Simone e Emilio e vovó Lola. Obrigada por todo amor, carinho e cuidado.

Aos meus avôs Josué, Pedro e Vera (*in memoriam*) que foram repentinamente tirados de mim. Saibam que o sonho de ter a neta formada foi realizado e sempre amarei vocês.

Ao meu gordinho Diorgenes, que cuida de mim e que me dá suporte em todos os momentos (bons ou ruins). Sempre me faz acreditar que posso ir mais longe.

A todos do NUDFAC que foram parceiros todos esses anos. Compartilhamos muitos momentos de alegrias, tristezas, e correrias para não perder experimentos. Tudo isso nos tornou mais fortes como grupo e amigos. Muito obrigada a todos. Juliana, em especial, agradeço por todo ensinamento e parceria. Tempo ruim não era nosso lema.

À minha orientadora, Profa. Leila. Para mim, representa uma das mulheres mais fortes que eu já vi. É uma inspiração de perseverança e garra. Muito obrigada pela paciência e cuidado.

Ao Prof. Davi que leu meu trabalho, fazendo considerações importantes para enriquecê-lo. Muito obrigada pela credibilidade e aprendizado.

Ao prof. Danilo pela ajuda no desenvolvimento da parte analítica, e pela confiança de que eu poderia manusear equipamentos analíticos, com o devido treinamento, claro.

À Profa. Danielle Macêdo, por toda disponibilidade e colaboração no estudo microbiológico.

À Profa. Begoña Charro, por toda a colaboração nesse projeto. É uma super parceira do NUDFAC e suas vindas ao Brasil sempre são motivos de alegria para nós.

À Capes pela concessão da bolsa de mestrado e à organização inglesa *The Academy of Medical Science* pelo financiamento de todo material de consumo utilizado na realização deste trabalho, através de convênio firmado entre a Universidade Federal de Pernambuco e a *University of Bath/ UK*.

RESUMO

A Onicomicose é uma infecção fúngica crônica da unha. Os efeitos desta infecção, quando não tratada, podem incluir dor, infecções bacterianas secundárias e constrangimento emocional devido à desfiguração das unhas afetadas. A unha é a barreira mais resistente da estrutura ungueal para a penetração de fármacos, devido a sua composição e presença de pontes dissulfeto que interligam as fibras de queratina. Isto está, portanto, diretamente relacionado a baixa eficácia do tratamento com antifúngicos (AFs) tópicos a partir de formulações comercialmente disponíveis. Diante disto, os AFs orais são ainda, amplamente utilizados. Todavia, causam diversos efeitos colaterais e riscos significativos quanto às interações medicamentosas. Um destes fármacos é a terbinafina (TB-HCl). Até o momento, não existe no mercado uma formulação ungueal tópica aprovada contendo TB-HCl para tratamento de onicomicose. Diante disto, o objetivo deste trabalho foi desenvolver e avaliar o desempenho de formulações ungueais contendo TB-HCl. A relevância da microporação ungueal como auxiliar na permeação e a eficácia microbiológica *in vitro* foram também investigadas. Para tanto, a solubilidade do TB-HCl foi avaliada em diferentes solventes e formulações de termogel, microemulsão e cristal líquido, contendo 2-7% do fármaco, foram desenvolvidas. Foram realizadas avaliações de liberação (IVRT) em 2 tipos de membranas artificiais hidrofóbicas e permeação ungueal (IVPT) mediante recortes de unhas humanas, obtidas de voluntários saudáveis, após TCLE assinado. Assim, empregou-se células verticais de difusão de Franz com e sem adaptadores de unha. No IVPT foram realizados três arranjos de testes: no primeiro foi aplicada uma dose múltipla em unhas não poradas (MD-NP), já no segundo, foi aplicada dose única em unhas microporadas (SD-MP) com o dispositivo Hydra.needle™□, e, no terceiro, dose única em unhas com microcanais induzidos por uma lâmina de tungstênio (SD-MC). Os estudos duraram 14 dias, seguidos da quantificação do fármaco no líquido receptor (LR) e avaliação da retenção do fármaco na unha. O TB-HCl apresentou alta solubilidade no propilenoglicol e misturas contendo este solvente; a quantidade cumulativa liberada de TB-HCl, através das membranas artificiais, indicam que a escolha do tipo de membrana é crítica em ensaios de liberação do fármaco. Comparando os experimentos de IVPT utilizando MD-NP e SD-MP, os resultados sugeriram que o arranjo SD-MP favoreceu a permeação do fármaco. Após a microporação, foi verificada retenção maior para os termogeis, sugerindo uma possível maior capacidade de adesão do polímero utilizado. Ao mesmo tempo, observou-se quantidades permeadas de TB-HCl superiores a partir das formulações microemulsionadas, demonstrando a capacidade desse sistema em potencializar a permeação através da lâmina ungueal, após o

auxílio do promotor físico. Ao comparar o novo promotor físico (formação de microcanais) com o Hydra.needle®, utilizado no segundo experimento, a retenção do TB-HCl a partir da microemulsão foi semelhante, independente do aparelho utilizado. No entanto, a retenção após aplicação dos termogéis foi aproximadamente 2x maior. A permeação da ME5 7% foi cerca de 10x maior comparado ao TG 4%, tornando-a uma excelente escolha para testes futuros. Na avaliação microbiológica utilizando LR vindo do SD-MP, a microemulsão foi a única que apresentou halo contra o *Trichophyton rubrum* e *Candida*.

Palavras-chave: onicomicose; terbinafina; unhas; tópico; ensaio *in vitro*.

ABSTRACT

Onychomycosis is a chronic fungal nail infection. The effects of the infection, when untreated, can include pain, secondary bacterial infections and emotional embarrassment due to disfigurement of the affected nails. The nail is the most resistant barrier of the nail structure for the penetration of drugs, due to its composition and the presence of many disulfide bonds that interconnect the keratin fibers. This is, therefore, directly related to the low efficacy of treatment with topical antifungals (AFs) from commercially available formulations. Consequently, oral AFs are still widely used. However, they cause several side effects, and significant risks concerning drug interactions. One of these drugs is terbinafine (TB-HCl). To date, there is no approved topical nail formulations on the market containing this drug for the treatment of onychomycosis. Therefore, the aim of this work was to develop and evaluate the performance of nail formulations containing TB-HCl. The relevance of nail microporation as an aid in permeation and the microbiological efficacy *in vitro* were also investigated. Therefore, the solubility of TB-HCl was evaluated in different solvents and thermogel, microemulsion and liquid crystal formulations containing 2-7% of the drug were developed. Release assessments (IVRT) were performed on 2 types of hydrophobic artificial membranes and nail permeation (IVPT) using clippings of human nails, obtained from healthy volunteers, after signed TCLE. For this, vertical Franz diffusion cells with and without nail adapters were used. In the IVPT, three test arrangements were carried out: In the first, a multiple dose was applied to non-porous nails (MD-NP), in the second, a single dose was applied to microporous nails (SD-MP) with the Hydra.needle™ device, and in the third, a single dose was applied on nails after the formation of microchannels produced with a tungsten blade (SD-MC). All studies lasted 14 days, followed by quantification of drug in the recipient fluid and assessment of drug retention in the nail. TB-HCl showed high solubility in propyleneglycol and mixtures containing this solvent; the cumulative amount of TB-HCl released through artificial membranes indicates that the choice of membrane type is critical in drug release assays. Comparing the IVPT experiments using MD-NP and SD-MP, the results suggested that the SD-MP arrangement favored drug permeation. After the microporation, greater retention was for thermogels, suggesting a possible greater adhesion capacity of the polymer used. At the same time, higher permeated amounts of TB-HCl were observed from the microemulsions, demonstrating the ability of this system to enhance the transport of the drug through the nail, after the aid of the physical permeation promoter. When comparing the new physical promoter (formation of microchannels) with Hydra.needle™, used in the second experiment, the retention of TB-HCl

from the microemulsion was similar, regardless of the device used. However, retention after application of thermogels was approximately 2x higher. The permeation of ME5 7% was about 10x compared to TG 4%, making microemulsion an excellent choice for future trials. In the microbiological evaluation using the LR from SD-MP, the microemulsion was the only one that showed a halo against *Trichophyton rubrum* and *Candida*.

Key words: onychomycosis; terbinafine; nails; topical; *in vitro* assay.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 -	Anatomia da unha.....	24
Figura 2 -	Onicomicose subungueal distal e lateral.....	26
Figura 3 -	Onicomicose subungueal proximal.....	27
Figura 4 -	Onicomicose superficial branca.....	27
Figura 5 -	Onicomicose endoníaca.....	28
Figura 6 -	Onicomicose distrófica total.....	28
Figura 7 -	Onicomicose causada por <i>Scytalidium dimidiatum</i>	30
Figura 8 -	Onicólise por causada por <i>Candida albicans</i>	31
Figura 9 -	<i>Tinea unguium</i> . (Onicomicose subungueal distal e lateral por <i>T. rubrum</i>).....	33
Figura 10 -	Macrocolônia de <i>Trichophyton Rubrum</i>	35
Figura 11 -	Microcultivo do <i>Trichophyton Rubrum</i> . macroconídios em forma de charuto (a) e microconídios clavados delgados (b).....	35
Figura 12 -	Desenho esquemático do microcultivo.....	35
Figura 13 -	Aplicação tópica ungueal.....	37
Figura 14 -	Estrutura química do cloridrato de terbinafina (TB-HCl).....	42
Quadro 1 -	Outros tipos de associações de terapias combinadas.....	44
Figura 15 -	Adaptador de unhas PermeGear® (A) e Célula de difusão de Franz vertical com o adaptador (B).....	46
Figura 16 -	Antes e depois da drenagem do hematoma.....	50
Figura 17 -	PathFormer®.....	50
Figura 18 -	Célula vertical de difusão de Franz.....	61
Figura 19 -	Lixamento de unhas (A), microporação (B) e realização de microcanaís (C).....	62
Figura 20 -	Adaptador ungueal PermeGear para as células de Franz (a) e montagem da unha no adaptado (b).....	64
Figura 21 -	Esquema do modelo <i>in vitro</i> adaptado de Slevén <i>et al.</i> (2015). (A): conjunto unha-frasco antes do fechamento, (B): conjunto unha-frasco colocado em SDA durante a etapa de pré-carga, (C): imagem representativa do halo de inibição formado.....	67
Figura 22 -	Esquema da seleção de artigos.....	68

Gráfico 1 -	Distribuição dos tipos de membranas biológicas utilizadas nos trabalhos.....	69
Figura 23 -	Amplitude de publicações por países.....	70
Figura 24 -	Cromatograma referente ao ponto 50 µg/mL.....	72
Figura 25 -	Cromatograma de tampão fosfato + 0.8% de Tween® 80.....	72
Figura 26 -	Gráfico das respostas em função da concentração do TB.....	74
Figura 27 -	Diagrama de fase pseudoternário da região de existência dos sistemas microemulsionados (os pontos verde e vermelho estão correlacionados com ME2 e ME5, respectivamente).....	80
Figura 28 -	Lâmina comercial com lâmina ajustável (A), Canais na face dorsal da unha evidenciados dentro do adaptador (B e C). Fotomicrografia da unha após lixamento e formação dos microcanais (D e E). (a) 64,28µm. (b) 149µm.....	83
Figura 29 -	Liberação cumulativa <i>in vitro</i> de TB-HCl (média ± DP, n=6) a partir de microemulsões (ME2 2%, ME2 5% E ME5 7%), termogeis (TG 2%, TG 4%, TGKA 2%, TGKA 4%) e cristal líquido (CL2%) através de membranas hidrofóbicas (Silicone e PTFE).....	85
Figura 30 -	Quantidade retida na unha de TB-HCl nas formulações ungueais do primeiro (MD-NP) x segundo experimento (SD-MP).....	87
Figura 31 -	Quantidade retida na unha de TB-HCl de todas as formulações ungueais no segundo experimento (SD-MP).....	88
Figura 32 -	Fluxo entre 7 e 14 dias do segundo experimento (SD-MP).....	89
Figura 33 -	Ensaio microbiológico <i>in vitro</i> . Líquido receptor do segundo teste IVPT (SD-MP) a partir da ME5 7% após 14 dias.....	90
Figura 34 -	Quantidade retida nas unhas e a quantidade permeada cumulativa para o segundo (SD-NP) x terceiro experimento.....	91
Figura 35 -	Frasco com formulação ME5 7% na presença de <i>C. parapsilosis</i> : Halo visualizado lateralmente (à esquerda); Visão superior do halo (à direita).....	92
Figura 36 -	Frasco com formulação TG4% na presença de <i>C. parapsilosis</i> : Sistema visualizado lateralmente (à esquerda); Visão superior do frasco (à direita)	93

Figura 37 -	Frascos com formulação na presença de <i>C. albicans</i>	94
Figura 38 -	Unhas após desmonte do conjunto unha-frasco (à esquerda); (B) Triplicata da mesma amostra de unha inoculada em meio (sem crescimento de massa celular) (à direita).....	95

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Dose e duração dos tratamentos sistêmicos contínuo e em pulsos para onicomicoses nas mãos.....	40
Tabela 2 -	Dose e duração dos tratamentos sistêmicos contínuo e em pulsos para onicomicoses nos pés.....	40
Tabela 3 -	Composição das misturas de solventes (em percentual).....	57
Tabela 4 -	Resultados das avaliações estatísticas realizadas.....	73
Tabela 5 -	Resultados da Repetibilidade.....	74
Tabela 6 -	Dados experimentais da precisão intermediária (analista A e analista B).....	75
Tabela 7 -	Análise estatística aplicada da precisão intermediária.....	75
Tabela 8 -	Dados experimentais da exatidão.....	76
Tabela 9 -	Análise estatística aplicada da exatidão.....	77
Tabela 10 -	Solubilidade de TB-HCl (média $\pm$ DP, n = 3) em uma série de solventes puros, misturas binárias, ternárias e quaternárias.....	77
Tabela 11 -	Composição dos sistemas microemulsionados.....	79
Tabela 12 -	Composição de todas as formulações desenvolvidas.....	80
Tabela 13 -	Características e estabilidade das formulações de microemulsionadas.....	81
Tabela 14 -	Liberação cumulativa de TB-HCl (média $\pm$ DP; n = 6) expressa como porcentagem da dose aplicada através de membrana hidrofóbica (Silicone).....	84
Tabela 15 -	Liberação cumulativa de TB-HCl (média $\pm$ DP; n = 6) expressa como porcentagem da dose aplicada através de membrana hidrofóbica (PTFE).....	84
Tabela 16 -	TB-HCl retido na unha, após o primeiro teste (MD-NP). Dados individuais de cada experimento são mostrados. Dados expressos em massa de fármaco/massa de unha.....	86
Tabela 17 -	TB-HCl retido na unha, após segundo teste (SD-MP). Dados individuais de cada experimento são mostrados. Dados expressos em massa de fármaco/massa de unha.....	86

Tabela 18 -	Fluxos de TB-HCl entre 7 e 14 dias de experimento, após o segundo teste (SD-MP). Dados individuais de cada experimento são mostrados.....	89
Tabela 19 -	Comparativo de TB-HCl retido na unha e quantidade cumulativa de TB-HCl permeado, seguindo o segundo (SD-MP) e o terceiro teste (SD-MC). Dados individuais de cada experimento são mostrados.....	91

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACN	- Acetonitrila.
AFs	-Antifúngicos.
ANOVA	- Análise de Variância.
ANVISA	- Agência Nacional de Vigilância Sanitária.
AU	-Aparelho ungueal.
CAAE	-Certificado de Apresentação de Apreciação Ética.
CB	-Casco bovino.
CEP/UFPE	- Comitê de Ética em Pesquisa/Universidade Federal de Pernambuco.
CL	- Cristal líquido.
CLAE	- Cromatografia Líquida de Alta Eficiência.
CPO	- Ciclopirox Olamina.
CQA	- Controle de qualidade alto.
CQB	- Controle de qualidade baixo.
CQM	- Controle de qualidade médio.
CV	-Coeficiente de variação.
CYP	-Citocromo P.
DCV	- Detector de comprimento de onda variável.
D.P.	- Desvio Padrão.
EUA	- Estados Unidos da América.
FDA	- <i>Food and Drug Administration</i> .
FFND	- Fungos filamentosos não dermatófitos.
FLZ	- Fluconazol.
HIV	- Vírus da imunodeficiência humana.
HPLC	- <i>High Performance Liquid Chromatography</i> .
ITZ	- Itraconazol.
IVPT	- <i>in vitro permeation test</i> .
IVRT	- <i>in vitro release test</i> .
kGy	-Kilogray.
LD	- Limite de detecção.
LogP	- Coeficiente de Partição.
LQ	- Limite de quantificação.

LR	- Líquido receptor.
MC	-Microcanais.
MD-NP	- Dose múltipla em unhas não poradas.
ME	- Microemulsão.
MeOH	-Metanol.
MeSH	- <i>Medical Subject Headings</i> .
MP	-Microporação.
NA	-Não se aplica
ODT	- Onicomicose distrófica total.
OE	- Onicomicose endoníaca.
ONC	- Onicomicose.
OS	- Onicomicose superficial.
OSDL	- Onicomicose subungueal distal e lateral.
OSP	- Onicomicose subungueal proximal.
PBS	- <i>Phosphate-buffered saline</i> .
pH	- Potencial Hidrogeniônico.
pI	- Ponto isoelétrico.
PTFE	- Politetrafluoretileno.
RDC	- Resolução de diretoria colegiada.
SDA	-Ágar sabouraud.
SD-MC	- Dose única após o terceiro tratamento (Microcanais).
SD-MP	- Dose única em unhas microporadas.
SD-NP	-Dose única não porada.
SE	-Solução extratora.
SIDA	-Síndrome da imunodeficiência adquirida.
TB	-Terbinafina
TBF	- Terbinafina.
TB-HCl	-Cloridrato de Terbinafina.
TCLE	-Termo de consentimento livre e esclarecido
TEA	- Trietilamina.
TG	-Termogel.
TR	- <i>Trichophyton rubrum</i> .
UHC	-Unha humana de cadáver.

UHP	- Peróxido de hidrogênio-uréia.
UHS	-Unha humana saudável.
UK	- United Kingdom.
UV	-Ultravioleta.

LISTA DE SÍMBOLOS

%	- Por cento.
~	-Aproximadamente.
±	- Mais ou menos.
®	- Marca registrada.
µg	- Micrograma.
µL	- Microlitro.
µm	- Micrômetro.
cm ²	- Centímetro quadrado.
g	- Gramas.
h	- Horas.
M	- Concentração Molar.
mg	- Miligrama.
mL	- Mililitro.
mm	- Milímetro.
mM	- Milimolar.
n	-Número de amostras.
°C	- Grau Celsius.
pH	- Potencial hidrogeniônico.
r ²	- Coeficiente de determinação.
Rpm	- Rotações por minuto.
x	- <i>versus</i> .
mV	-Milivolts.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	21
2	OBJETIVOS.....	23
2.1	OBJETIVO GERAL.....	23
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	23
3	REVISÃO DE LITERATURA.....	24
3.1	ANATOMIA E COMPOSIÇÃO DA UNHA	24
3.2	ONICOMICOSE	25
3.2.1	Classificação clínica.....	26
3.2.2	Etiologia das onicomicoses.....	29
3.2.2.1	Onicomicose causadas por Fungos Filamentosos Não Dermatófitos.....	29
3.2.2.2	Onicomicose causadas por leveduras	30
3.2.2.3	Onicomicose causadas por dermatófitos	33
3.2.2.3.1	<i>Trichophyton rubrum</i>	34
3.2.3	Tratamento das Onicomicoses.....	36
3.2.3.1	Terapia tópica	36
3.2.3.2	Terapia sistêmica	39
3.2.3.2.1	<i>Terbinafina</i>	41
3.2.3.3	Terapia combinada	43
3.3	MODELO DE LIBERAÇÃO E PERMEAÇÃO UNGUEAL	44
3.4	PROMOTORES DE PERMEAÇÃO	47
3.4.1	Promotores químicos.....	47
3.4.2	Promotores físicos.....	48
3.5	FORMAS FARMACÊUTICAS TÓPICAS.....	51
4	METODOLOGIA.....	55
4.1	MATERIAIS.....	55
4.2	EQUIPAMENTOS	55
4.3	REVISÃO SISTEMÁTICA	55

4.4	ESTUDO DE SOLUBILIDADE DO CLORIDRATO DE TERBINAFINA	56
4.5	DESENVOLVIMENTO DAS FORMULAÇÕES UNGUEAIS DE CLORIDRATO DE TERBINAFINA.....	57
4.5.1	Desenvolvimento dos diagramas de fase pseudoternários	57
4.5.2	Desenvolvimento de Termogeis e preparação de cristal líquido	58
4.6	CARACTERIZAÇÃO DAS FORMULAÇÕES	58
4.6.1	Determinação do pH	58
4.6.2	Doseamento de Cloridrato de Terbinafina nas formulações desenvolvidas	59
4.6.3	Determinação do tamanho das gotículas e potencial zeta das microemulsões ..	59
4.6.4	Microscopia de luz polarizada.....	59
4.7	MÉTODO DE QUANTIFICAÇÃO POR CROMATOGRAFIA LIQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA COM DETECTOR DE COMPRIMENTO DE ONDA VARIÁVEL (CLAE–DCV)	59
4.8	ESTUDOS DA CINÉTICA DE LIBERAÇÃO <i>IN VITRO</i> , PERMEAÇÃO <i>EX VIVO</i> E RETENÇÃO UNGUEAL DO CLORIDRATO DE TERBINAFINA.....	61
4.8.1	Obtenção, preparo e avaliação microscópica das amostras de unha humana ...	62
4.8.2	Montagem do sistema manual de células verticais de difusão de Franz para os estudos de liberação e permeação	63
4.8.3	Avaliação de retenção ungueal.....	65
4.9	AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIFÚNGICA TÓPICA A PARTIR DE MODELO <i>IN VITRO</i> ADAPTADO.....	65
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	68
5.1	REVISÃO DE LITERATURA	68
5.2	MÉTODO DE QUATIFICAÇÃO POR CROMATOGRAFIA LIQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA COM DETECTOR DE COMPRIMENTO DE ONDA VARIÁVEL (CLAE–DCV)	71
5.2.1	Seletividade	72
5.2.2	Linearidade	73
5.2.3	Precisão e exatidão	74
5.3	ESTUDO DE SOLUBILIDADE DO CLORIDRATO DE TERBINAFINA	77

5.4	DESENVOLVIMENTO DAS FORMULAÇÕES UNGUEAIS DE CLORIDRATO DE TERBINAFINA	78
5.4.1	Desenvolvimento dos diagramas de fase pseudoternários	78
5.4.2	Desenvolvimento de Termogeis e preparação de cristal líquido	82
5.5	CARACTERIZAÇÃO DAS FORMULAÇÕES	81
5.6	ESTUDOS DE CINÉTICA DE LIBERAÇÃO <i>IN VITRO</i> , PERMEAÇÃO <i>EX VIVO</i> E RETENÇÃO UNGUEAL DO CLORIDRATO DE TERBINAFINA.....	82
5.6.1	Obtenção, preparo e avaliação microscópica das amostras de unha humana ...	82
5.6.2	Estudo de Cinética de Liberação <i>in vitro</i> (IVRT).....	83
5.6.3	Estudo de permeação <i>in vitro</i> (IVPT) e retenção ungueal	85
5.7	AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIFÚNGICA TÓPICA A PARTIR DE MODELO <i>IN VITRO</i>	91
6	CONCLUSÃO.....	96
	REFERÊNCIAS.....	97
	APÊNDICE A – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO.....	113

1 INTRODUÇÃO

A onicomicose (ONC) é uma infecção fúngica das unhas que pode afetar as unhas das mãos e dos pés. É responsável por 15 a 50% das doenças ungueais e pode acometer um ou mais componentes do aparelho ungueal, incluindo lâmina ungueal, matriz e leito ungueal (GUPTA; VERSTEEG; SHEAR, 2017; CHOUHAN; SAINI, 2012; FAERGEMANN; BARAN, 2003; MURTHY; MAIBACH, 2012; ZAIAS, 1985). Sua prevalência global foi estimada em 5,5%, afetando 3-8% da população do Reino Unido (AMEEN et al., 2014; SHAHZAD et al., 2014), 13,4% na América do Norte, 23% na Europa e 20% no Leste Asiático (GHANNOUM; ISHAM, 2014; GUPTA; VERSTEEG, 2016; THOMAS et al., 2010). Além da prevalência crescente, as falhas no tratamento são frequentes; a recorrência pode chegar a 50% por falta de cura e reinfecções micológicas (ELEWSKI; TOSTI, 2014; THOMAS et al., 2010). Ao mesmo tempo, a onicomicose não tratada pode piorar, disseminar-se para outros locais não infectados (outras unhas ou pele circundante) ou infectar outros pacientes (VALDES et al., 2018).

Devido ao alto custo e à baixa eficácia da terapia tópica (THOMAS et al., 2010; VALDES et al., 2018), obtida a partir de formulações comercializadas disponíveis no mercado contendo ciclopirox (CPO) 8%, amorolfina 5%, tavaborol 5% e efinaconazol 10%, novas estratégias (uso de promotores de permeação química e física) para a cura das onicomicoses foram propostas por diversos pesquisadores (HAO; SMITH; LI, 2008; KHENGAR et al., 2007; MONTI et al., 2011; MURDAN, 2008; PATEL; VORA, 2016).

Entre os promotores físicos estão a abrasão da superfície da lâmina ungueal, laser pulsado, ultrassom de baixa frequência, iontoforese e microporação (AMICHAÏ et al., 2010; NAIR; KIRAN VAKA; MURTHY, 2011). Em relação a este último, o PathFormer® é um dispositivo aprovado pela agência regulatória americana, FDA-US para trepanação controlada das unhas, criando orifícios macroscópicos na lâmina ungueal (CIOCON et al., 2006). A poração usando Clearanail® aumentou a permeação de CPO 8% em 3-4 vezes (DÍAZ et al., 2019) e o dermaroller também foi sugerido como uma ferramenta para facilitar a penetração de antifúngicos (FLORES et al., 2018).

Albarahmieh et al. (2019) usando patches de microagulhas solúvel, obteve grande quantidade de TB-HCl permeada através do casco bovino. Recentemente, o uso de Hydla.needle® (desenvolvido para aplicação de medicamentos na pele) (VERPAELE et al., 2019), associado ao lixamento de unhas, demonstrou aumento nas taxas de permeação e retenção do Ciclopirox olamina através de unhas humanas (dados do nosso grupo de pesquisa ainda não publicados). Mais estudos são necessários para melhor padronizar seu uso.

Até o momento, não existe no mercado uma formulação ungueal eficiente e aprovada contendo TB-HCl para tratamento tópico de onicomicose. Considerando que o tipo de formulação farmacêutica afeta a permeação através da placa ungueal (TANRIVERDI; ÖZER, 2013b) inúmeras pesquisas científicas tem sido realizadas tendo como objetivo o desenvolvimento de diferentes formas farmacêuticas ungueais (géis, microemulsão, gel à base de microemulsão, lipossomas, microesferas injetáveis de PLGA, sistemas nanovesiculares) contendo o TB-HCl nas concentrações de 1 e 2% (ANGAMUTHU et al., 2014; ELSHERIF; SHAMMA; ABDELBARY, 2017; THATAI; SAPRA, 2017, 2018).

Com base no exposto, o objetivo deste trabalho foi desenvolver diferentes formas farmacêuticas utilizando TBF-HCl em concentrações iguais e superiores a 2%, baseado nos dados obtidos do estudo de solubilidade deste fármaco em diferentes solubilizantes farmacêuticos, e avaliar sua permeação em unhas humanas saudáveis, com e sem tratamentos físicos (Hydra.needle® e um novo dispositivo), além de avaliar a atividade microbiológica contra a *Candida albicans*, *Candida parapsilosis* e *Trichophyton rubrum*, como teste complementar.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Desenvolver e avaliar o desempenho de formulações ungueais contendo Cloridrato de Terbinafina para o tratamento de onicomicoses.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Realizar revisão sistemática acerca dos estudos de permeação ungueal que testaram formulações tópicas contendo Cloridrato de Terbinafina (TB-HCl);
- Avaliar a solubilidade do TB-HCl em diferentes tensoativos, óleos e solventes;
- Desenvolver formulações ungueais contendo TB-HCl;
- Realizar caracterização das formulações obtidas quanto ao pH, características organolépticas e doseamento do fármaco;
- Realizar caracterização das microemulsões obtidas quanto ao tamanho de gotícula, potencial zeta e isotropia ou anisotropia dos sistemas por microscopia de luz polarizada;
- Realizar procedimento físico de lixamento e formação de microcanais nas unhas humanas saudáveis e avaliar microscopicamente as unhas após este processo;
- Validar metodologia analítica por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE-DCV) para quantificação do TB-HCl nas formulações desenvolvidas e nos ensaios de liberação *in vitro* e permeação ungueal *ex vivo*;
- Realizar cinéticas de liberação *in vitro* do TB-HCl a partir das formulações desenvolvidas, utilizando duas diferentes membranas sintéticas;
- Realizar a permeação *ex vivo* do TB-HCl a partir das formulações desenvolvidas, utilizando unhas humanas saudáveis lixadas, microporadas e com microcanais;
- Avaliar a inibição microbiológica dos líquidos receptores após ensaio de permeação *ex vivo*, contra o *Trichophyton rubrum*, *Candida albicans* e *Candida parapsilosis*;
- Avaliar a atividade antifúngica tópica das formulações desenvolvidas a partir de modelo *in vitro* adaptado.

3 REVISÃO DE LITERATURA

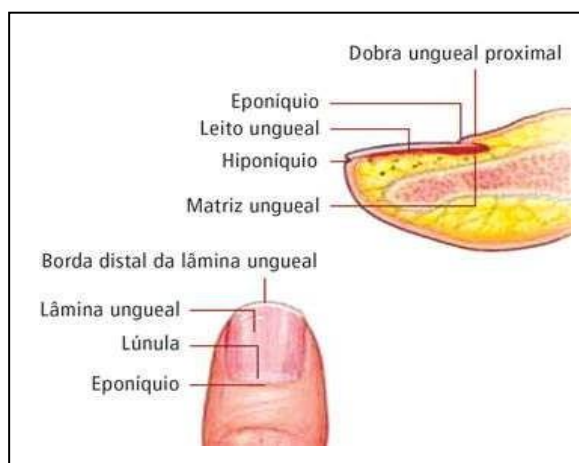
3.1 ANATOMIA E COMPOSIÇÃO DA UNHA

A unha é um anexo cutâneo que está localizado na superfície dorsal da falange distal dos dedos das mãos e pés. Ela é constituída por água, lipídeos e principalmente queratina (DE BERKER, 2013; JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2004).

Esse anexo cutâneo é compreendido por um conjunto de estruturas, onde cada uma exerce um papel importante entre estas; função de proteção, destreza ao manipular objetos, parte integrante da estrutura sensorial da mão, além do seu papel estético (HANEKE, 2006; HANEKE et al., 2014; TORRES-RODRÍGUEZ; LÓPEZ-JODRA, 2000).

O aparelho ungueal (AU) é formado basicamente pelas seguintes estruturas (Figura 1): matriz, lâmina ungueal, leito, hiponíquio e dobras ungueais (laterais e proximal) (GREGORIOU et al., 2008). É extremamente organizado e, quando há o dobramento da pele, já se pode visualizar o primeiro componente estrutural: a dobra ungueal proximal que se encontra aderida à lâmina ungueal através da cutícula (eponíquio) (DE BERKER, 2013; HANEKE, 2006).

Figura 1- Anatomia da unha.



Fonte: Adaptado de (GREGORIOU et al., 2008).

A matriz de um tecido germinativo o qual se divide e diferencia-se, produzindo a queratina da unha e é também responsável por produzir a placa/lâmina ungueal. A lâmina ou placa ungueal é a unha propriamente dita. É constituída por células córneas anucleadas

organizadas em um estrato compacto e duro (HANEKE, 2006; HANEKE et al., 2014; DE BERKER, 2013).

A sua parte proximal é coberta por uma extensão de pele, a dobra ungueal, que por sua vez, é protegida pelo eponíquio (cutícula). Nessa região encontra-se também a lúnula. Ela tem o formato de meia-lua e, apesar de estar próximo a unha, é a porção visível da matriz ungueal (extremidade distal). A porção ventral da placa consiste em uma queratina flexível e está firmemente ligada ao leito (DE BERKER, 2013; MAHONEY; BENNET; OLSEN, 2003; RICHARDSON; EDWARD, 2000).

O leito ungueal está fortemente aderido à lâmina ungueal e possui coloração rósea em virtude da presença dos capilares que nutrem o tecido. Já as dobras ungueais laterais protegem e delimitam lateralmente a unha (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2004).

É importante salientar que a unha é composta por moléculas de queratina com ligações do tipo dissulfeto e hidrogênio. Devido à presença dessas ligações, as fibras de queratina ficam fortemente interligadas, tornando a lâmina ungueal dura e rígida (ELKEEB et al., 2010; MURDAN, 2002). Somado a isto, a idade e sexo são fatores que podem diferir na composição da unha (VEJNOVIC; HUONDER; BETZ, 2010).

Dessa forma, entender a estrutura, a composição e as propriedades ungueais é fundamental para a compreensão da patogênese das micoses e também para o desenvolvimento de medicamentos para aplicação sobre o tecido alvo (VEJNOVIC; HUONDER; BETZ, 2010).

3.2 ONICOMICOSE

As onicomicoses (ONCs) são infecções fúngicas que podem acometer as unhas dos pés e das mãos. Elas são responsáveis por cerca de 50% de todas as doenças causadas nas unhas (FAERGEMANN; BARAN, 2003; GUPTA; MAYS, 2018). Trata-se de uma infecção comum e sua prevalência aumenta devido a alguns fatores como idade da população, diabetes, psoríase, imunodeficiência (EFFENDY et al., 2005; ROBERTS, 1992; SCHER; BARAN, 2003). As ONCs estão em destaque nas patologias de regiões tropicais, principalmente devido ao clima quente e úmido (ZANARDI et al., 2008). Isso, porém, não exclui o fato de que em climas moderados possam ter pessoas acometidas com tal infecção (CHI; WANG; CHOU, 2005). Essas infecções resultam em transtornos psicossociais e consequências ocupacionais, reduzindo a qualidade de vida (DANIEL, 2013; SCHER, 1996). Além disso elas podem causar dor e morbidade (REPKA et al., 2002; TRAYNOR et al., 2010).

3.2.1 Classificação clínica

As onicomicoses foram classificadas por Roberts; Evans; Allen, (1990) em onicomicose subungueal distal e lateral (OSDL), onicomicose branca superficial (OBS), onicomicose subungueal proximal (OSP) ou onicodistrofia total (OT) de acordo com as formas clínicas.

Visando melhor correspondência entre esta classificação e o diagnóstico micológico laboratorial, Hay & Baran (2011) propuseram uma nova classificação no intuito de facilitar o reconhecimento para diagnóstico clínico. Na atual classificação encontram-se cinco tipos de infecção denominadas: onicomicose subungueal distal e lateral (OSDL), onicomicose subungueal proximal (OSP), onicomicose superficial (OS), onicomicose endoníaca (OE) e onicomicose distrófica total (ODT) (HAY; BARAN, 2011).

a) Onicomicose subungueal distal e lateral (OSDL): variedade clínica mais frequente (90%); a invasão se inicia no bordo (distal e lateral) livre da unha (Figura 2), onde o fungo invade a porção inferior da placa ungueal, na camada córnea do hiponíquio. Ela pode se estender de forma lenta e progressiva até o setor proximal da unha. É caracterizada com a presença de descolamento da unha (onicólise) com hiperqueratose associada a despigmentação. Normalmente são de cor branco ou amarelado (HAY; BARAN, 2011).

Figura 2- Onicomicose subungueal distal e lateral.



Fonte: (SOUZA, 2007).

b) Onicomicose subungueal proximal (OSP): é a infecção menos comum quando comparado às demais. Porém, é comumente encontrada em indivíduos com síndrome da imunodeficiência adquirida (SIDA) (AMEEN et al., 2014; DANIEL; NORTON; SCHER, 1992). Nesses casos, a infecção se alastra mais rápido. A invasão fúngica se inicia abaixo da

borda ungueal proximal (Figura 3) e subsequentemente, na lâmina ungueal. Manchas brancas emergem da porção interna da borda ungueal, podendo se espalhar e com a evolução ocorre um deslocamento da unha na proximidade da cutícula, tornando-se turva e espessa (HAY; BARAN,2011).

Figura 3 - Onicomicose subungueal proximal.



Fonte: (HAY; BARAN, 2011)

c) Onicomicose superficial (OS): é também chamada de onicomicose superficial branca, porém a coloração das unhas nem sempre será branca. Ela variará de acordo com o agente causador da infecção. As unhas podem apresentar manchas difusas ou estrias transversais (Figura 4). Caracteriza-se pela penetração superficial em direção ao interior da lâmina ungueal, podendo ser facilitada por traumas anteriores. Infecção de difícil tratamento, requer terapia oral. É mais comumente observada nas unhas dos pés (HAY; BARAN, 2011).

Figura 4 - Onicomicose superficial branca.



Fonte: (DE BERKER, 2009).

d) Onicomicose endoníaca: Nessa infecção, a invasão fúngica se dá diretamente através do ataque à queratina da lâmina ungueal (Figura 5). Distingue-se histopatologicamente pela ausência de inflamação e fungos no leito ungueal ou espessamento, muitas hifas fúngicas encontram-se no interior da placa ungueal (HAY; BARAN, 2011).

Figura 5 - Onicomicose endoníaca.



Fonte: HAY; BARAN, 2011.

e) Onicomicose distrófica total (ODT): é o estágio final das onicomicoses causadas por dermatófitos, não dermatófitos ou *Candida sp.* Considerada uma evolução das formas anteriores citadas, quando não há tratamento. Há o acometimento da totalidade da unha, como observado na Figura 6. Nesse estágio, existe maior risco de desenvolver infecções secundárias como a bacteriana, podendo também acometer a circulação periférica (AMEEN et al., 2014; HAY; BARAN, 2011; LACAZ et al., 2002).

Figura 6 - Onicomicose distrófica total.



Fonte: (ATAIDES et al., 2011).

3.2.2 Etiologia das onicomicoses

A ONC é causada pela presença de fungos na unha e o aprofundamento sobre estrutura e composição desses microrganismos é fundamental para a compreensão da patogênese. Os fungos são seres eucarióticos, heterotróficos. Possuem no citoplasma: mitocôndrias, núcleo bem definido, complexo de golgi, ribossomos ligados ao retículo endoplasmático (SIDRIM; ROCHA, 2004).

Em sua arquitetura celular, a membrana e parede celular são muito importantes e atuam como barreiras de proteção. A primeira é constituída por lipídios, glicoproteínas e esteróis (ergosterol) e a segunda é constituída principalmente por quitina (BOWMAN; FREE, 2006; TORTORA; CASE; FUNKE, 2012).

Esses microrganismos podem ser unicelulares ou pluricelulares e seus representantes são, respectivamente leveduras e fungos filamentosos. A forma filamentosa é constituída de um conjunto de hifas que, quando agrupadas, formam o micélio. Já a levedura não possui tal organização por se tratar de um organismo unicelular (TORTORA; CASE; FUNKE, 2012). Os fungos estão inseridos em três grandes grupos: dermatófitos, leveduras e fungos filamentosos não dermatófitos (FFND). O primeiro grupo é o mais frequente (BARAN; KAOUKHOV, 2005), seguido das leveduras (CAVALLERA; ASBATI, 2006).

3.2.2.1 Onicomicose causadas por Fungos Filamentosos Não Dermatófitos

Os gêneros mais comuns nas infecções ungueais são: *Scopulariopsis*, *Scytalidium*, *Fusarium* e *Aspergillus* (DE ARAÚJO et al., 2003; GIANNI; CERRI; CROSTI, 2000) (Figura 7). Eles são considerados contaminantes do ambiente, apresentando-se como agentes oportunistas (DE MAGALHÃES LIMA et al., 2008). Onicomicose secundária a fungos não-dermatófitos é visto mais frequentemente em idosos, em pacientes com doenças de pele que acometem as unhas e em pacientes imunocomprometidos (KASHYAP; BHALLA; KAUR, 2008). É mais comum observar a infecção nos pés do que nas mãos, devido ao maior contato com o solo (GUPTA et al., 2003).

Figura 7 - Onicomicose causada por *Scytalidium dimidiatum*.



Fonte: (HAY et al., 2018).

3.2.2.2 Onicomicose causadas por leveduras

O gênero mais comumente encontrado nas infecções ungueais é *Candida*, sendo a *Candida albicans* mais provável de ser o patógeno na unidade ungueal (RALPH DANIEL III et al., 1998). Outras espécies de *Candida*, incluindo *C. tropicalis*, *C. krusei*, *C. parapsilosis* e *C. Guilliermondii* também podem acometer a unha (RALPH DANIEL III et al., 1998).

ONCs causadas por *Candida* é observada com mais frequência acometendo as unhas das mãos (Figura 8), quando comparado com unhas dos pés, em pessoas do gênero feminino (DE MAGALHÃES LIMA et al., 2008; JAIN; SEHGAL, 2000).

Isso ocorre devido ao fator ocupacional, entre estes, os serviços domésticos, devido à grande exposição à umidade e a produtos químicos (JAIN; SEHGAL, 2000; JAYATILAKE; TILAKARATNE; PANAGODA, 2009).

Além disso, *Candida* pode ser um patógeno primário ou secundário como causador da onicomicose. Seu papel como patógeno primário é quase sempre visto em imunossupressão grave, como infecção por SIDA (RALPH DANIEL III et al., 1998). Em condições como desnutrição, hábitos pessoais como tabagismo e traumas crônicos, a *Candida* pode atuar como um patógeno secundário (GUPTA et al., 2000; JAYATILAKE; TILAKARATNE; PANAGODA, 2009).

Figura 8 - Onicólise por causada por *Candida albicans*.



Fonte: (HAY et al., 2018).

Para esse trabalho, das espécies de *Candida* citadas, duas serão dadas ênfase:

a) *Candida albicans*

A *Candida* é um fungo comensal nos humanos sadios e sua relação interespecífica harmônica é determinada pelo equilíbrio delicado entre a virulência do fungo e a imunidade do hospedeiro (JAYATILAKE; TILAKARATNE; PANAGODA, 2009; HAY, 2013).

Quando há o desequilíbrio, a *Candida* passa a ser um possível agente etiológico de infecções. Dessa forma, infecções oportunistas devido a *Candida* geralmente anunciam problemas subjacentes de imunidade do hospedeiro. A candidíase superficial, a forma mais comum de infecções relacionadas à *Candida*, pode envolver um ou mais tecidos mucocutâneos, incluindo pele, membrana mucosa, cabelos e unhas (HAY, 1999).

A onicomicose por *Candida* comumente afeta as unhas das mãos quando comparadas a dos pés (ELEWSKI, 1998), sendo a *Candida albicans* o microrganismo com maior probabilidade de ser o patógeno (DANIEL et al., 1998). São microrganismos comumente associados a onicomicoses do tipo subungueal distal e lateral e distrófica total (HAY et al., 2018).

Alguns autores apontam para a *Candida albicans* como agente causador da paroníquia por *Candida*. É caracterizada pela invasão da placa ungueal após ter afetado os tecidos moles ao redor da unha. Esses tecidos circundantes demonstram inflamação e ficarão vermelhos e edematosos (SINGAL; KHANNA, 2011).

Com relação a patogênese, há múltiplos mecanismos de virulência envolvidos nessas infecções, mas nada totalmente elucidado. Tem-se demonstrado que esse fungo, por exemplo, é capaz de produzir partículas de melanina *in vitro*, bem como durante a infecção de tecidos

(MORRIS-JONES et al., 2005). Os autores atribuíram a melanina fúngica como sendo artifício de defesa contra antifúngicos, peptídeos antimicrobianos, luz ultravioleta e temperatura.

No aspecto de caracterização morfológica esse fungo é uma levedura muito importante na clínica e, macroscopicamente, as suas colônias são tipicamente brancas ou amarelo-esbranquiçadas com consistência lisa ou pastosa. Por meio do cultivo feito em ágar farinha de milho é possível visualizar microscopicamente a presença de estruturas arredondadas e refringentes com uma parede celular espessa (clamidósporos) (KONEMAN et al., 2008).

Os blastoconídios também podem ser visualizados e se derivam por brotamento da célula-mãe. Esses podem permanecer ligados a ela, formando cadeias, as pseudohifas. Outra estrutura importante na sua identificação é a presença do tubo germinativo (KONEMAN et al., 2008).

b) *Candida parapsilosis*

Trata-se de uma levedura bastante peculiar quanto a descoberta da sua identificação. A partir de estudos baseados no Multilocus Sequence Typing (MLST), a *C. parapsilosis* foi separada em três grupos I, II e III onde cada grupo designa como nova espécie. Dessa forma, os isolados do grupo I permaneceram como *C. parapsilosis stricto sensu* e os grupos II e III para *C. orthopsilosis* e *C. metapsilosis*, respectivamente. Assim, o complexo *C. parapsilosis* passou a ser composto por três espécies distintas (TAVANTI, et al., 2005; CAROLIS et al., 2014).

C. parapsilosis tem uma distribuição extensa na natureza, podendo ser encontrado em solo, plantas, pele e mucosas (humana e animal) (TROFA; GÁCSER; NOSANCHUK, 2008, LUPETTI et al., 2002; BEDOUT; GÓMEZ, 2010). É um fungo leveduriforme oportunista causador de infecções sistêmicas, principalmente por sua afinidade por dispositivos intravasculares e materiais protéticos (GÓMEZ-MOLERO et al., 2021; TROFA; GÁCSER; NOSANCHUK, 2008).

É um fungo que, semeado em ágar sabouraud dextrose, possui colônias com características macroscópicas com forma arredondada, de coloração esbranquiçada, cremosa, brilhante (KIM; BISSATI; MAMOUN, 2006; DE BEDOUT; GÓMEZ, 2010; KONEMAN et al., 2008). Gómez-Molero et al. (2021) relatam que as colônias podem ser lisas ou enrugadas. As primeiras associadas a presença de células leveduriformes e as não lisas por células pseudo-hifas, ou uma mistura de ambas as formas. Já no aspecto micromorfológico as características apresentadas são células gigantes e pseudo-hifas (SILVA et al., 2012).

Apesar da *C. parapsilosis* ser agente etiológico em diversas infecções sistêmicas, como em casos de fungemia, endocardite, meningite, peritonite, também atua em tecidos externos, como unhas (TROFA; GÁCSE; NOSANCHUK, 2008).

É uma das espécies mais frequentemente isoladas do espaço subungueal das mãos humanas (TROFA; GÁCSE; NOSANCHUK, 2008). Sua colonização transitória do tegumento humano é pauta sobre se há apenas a relação comensal ou se trata de um patógeno nesse tipo de infecção.

Estudos como o de Mujica e colaboradores (2004) documentam o aumento da onicomicose por *C. parapsilosis*. Em um estudo retrospectivo entre 1990 e 2001 realizado por Mügge e colaboradores (2006), percebeu-se que *C. parapsilosis* foi o principal patógeno de levedura infectando unhas das mãos e dos pés dentre uma amostra envolvendo 5.077 amostras de unhas. Dessa forma, nota-se a necessidade de dar a devida ênfase a esse fungo emergente.

3.2.2.3 Onicomicose causadas por dermatófitos

A maioria dos casos de infecção fúngica das unhas é causada por fungos dermatófitos (ROBERTS, 1992) e *Tinea unguium* é o termo utilizado para as infecções ungueais causadas por eles (Figura 9). Os dermatófitos patogênicos humanos são fungos queratinofílicos e podem infectar a pele, unhas e cabelos humanos (BRILLOWSKA-DĄBROWSKA; SAUNTE; ARENDRUP, 2007). Eles são divididos em três gêneros *Trichophyton*, *Microsporum* e *Epidermophyton*. A caracterização das espécies de dermatófitos é baseada na morfologia e distribuição dos conídios ou estruturas de frutificação (WEITZMAN; SUMMERBELL, 1995).

Figura 9 - *Tinea unguium*. (Onicomicose subungueal distal e lateral por *T. rubrum*).



Fonte: (HAY et al., 2018).

As espécies de dermatófitos são classificadas em geofílicas, zoofílicas e antropofílicas de acordo com o habitat natural (GUPTA et al., 1998). Os geofílicos são comumente encontrados

no solo e não é comum causarem infecções fúngicas humanas. Os zoofílicos são espécies que colonizam animais, mas também são responsáveis por cerca de 30% das dermatofitoses humanas com presença de inflamação aguda. As espécies antropofílicas são adaptadas ao homem e são responsáveis por cerca de 70% das dermatofitoses humanas (WHITE et al., 2008).

Os fungos antropofílicos são geralmente transmitidos pelo contato humano próximo ou indiretamente, como o compartilhamento de roupas, pentes, escovas, toalhas e lençóis (GUPTA et al., 1998). As infecções nas unhas são causadas principalmente pelo dermatófito *Trichophyton Rubrum* (GUPTA; VERSTEEG; SHEAR, 2017a; HAGHANI et al., 2013) e por isso é o microrganismo alvo desse trabalho.

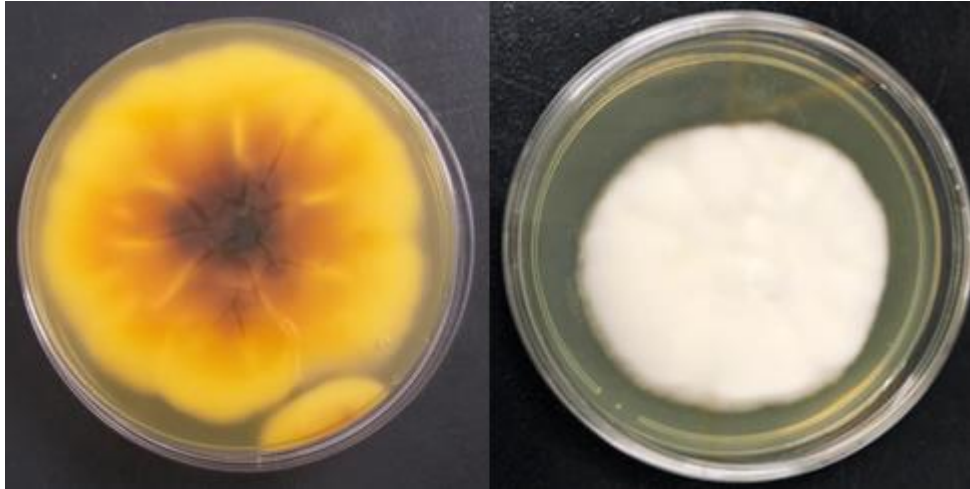
3.2.2.3.1 *Trichophyton rubrum*

Trata-se do microrganismo causador de 71% de todas as infecções nas unhas causadas por dermatófitos (FAERGEMANN; BARAN, 2003). É de suma importância, portanto, conhecê-lo bem para definir estratégias de combate. Segundo Lacaz *et al.* (2002), para a identificação e distinção do *Trichophyton Rubrum* (TR) das outras espécies de dermatófitos, se dar mediante a caracterização da colônia, observação microscópica da morfologia e arranjo dos elementos de frutificação, provas bioquímicas como a produção de urease, e o teste de perfuração do pelo *in vitro*.

Na caracterização da colônia são analisados os aspectos macroscópicos, como visualização de produção ou não de pigmento, aspecto do verso e anverso, textura. Já no microcultivo são visualizadas as características micromorfológicas, como disposição dos fusos ou macronídeos, superfície da parede, micronídios, hifa hialina ou demácea, septada ou cenocítica, forma, disposição e formação dos esporos (BRASIL, 2013; IOANNIDOU et al., 2006; LACAZ et al., 2002).

O TR no anverso da macrocolônia (Figura 10) tem aspecto cotonoso e branco, tornando-se posteriormente aveludadas. O verso da colônia (Figura 10) pode apresentar coloração que varia entre a pigmentação de avermelhada a rosa-púrpura. Os micronídeos são clavados ou piriformes com 2-3 por 3-5µm de tamanho, dispostos ao longo das hifas ou cachos. Os macroconídios geralmente estão ausentes, mas, quando presentes, são multisseptados lisos, de paredes finas, delgados e cilíndricos. Ele é considerado um fungo filamentoso, septado e hialino (Figuras 11 e 12).

Figura 10 - Macrocolônia de *Trichophyton Rubrum*.



Legenda: à esquerda está o verso e à direita está o anverso da macrocolônia.

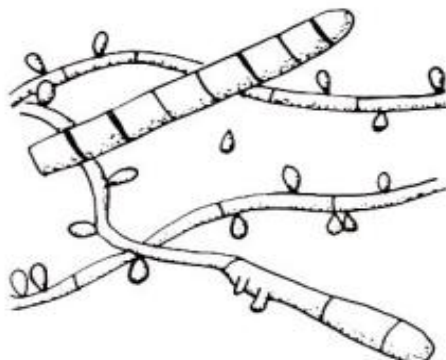
Fonte: a autora.

Figura 11- Microcultivo do *Trichophyton Rubrum*. macroconídios em forma de charuto (a) e microconídios clavados delgados (b).



Fonte: <https://www.adelaide.edu.au/mycology/fungal-descriptions-and-antifungal-susceptibility/dermatophytes/trichophyton#trichophyton-rubrum>

Figura 12- Desenho esquemático do microcultivo



Fonte: <http://portalbrasil.net/downloads/micoses.pdf>

3.2.3 Tratamento das Onicomicoses

Atualmente a terapêutica para as onicomicoses está baseada em três tratamentos distintos: terapia tópica (incluindo avulsão, desbridamento da lâmina ungueal afetada e medicamentosa), terapia sistêmica (medicamentosa) e terapia combinada (GUPTA; VERSTEEG; SHEAR, 2017a). O tratamento é baseado no tipo, causa e gravidade da ONC. Se não tratadas, essas infecções podem afetar a qualidade de vida além de poder ocasionar uma infecção secundária (GUPTA; STUDHOLME, 2016b).

3.2.3.1 Terapia tópica

a) Avulsão ungueal

A avulsão ungueal, que é a separação da lâmina ungueal do leito, pode ser realizada quimicamente, cirurgicamente (remoção física) ou através do desbridamento (mecânica). A primeira é um procedimento mais comumente utilizado na Europa, se comparado à América do Norte (GUPTA; PAQUET; SIMPSON, 2013). A avulsão química visa dissolver a ligação entre a lâmina ungueal e o leito ungueal (PANDHI; VERMA, 2012).

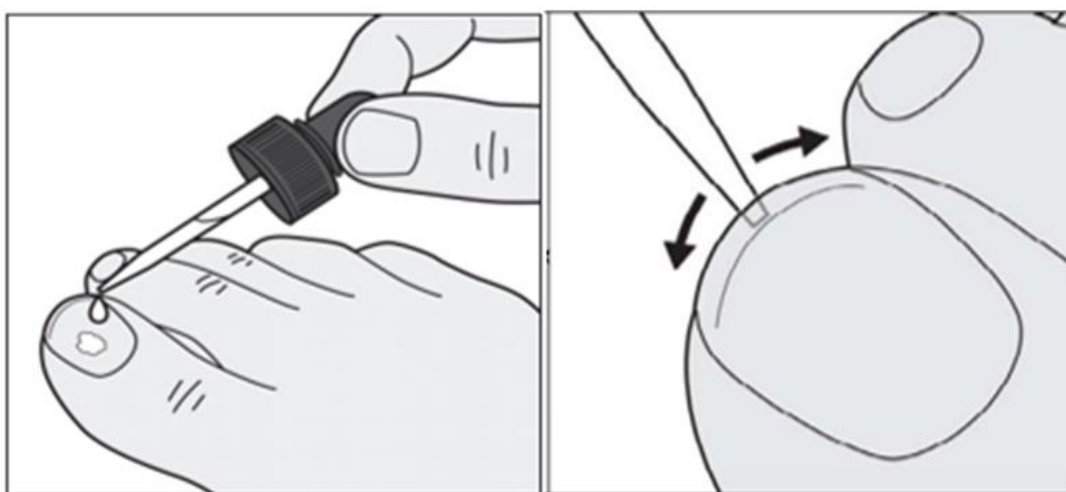
Normalmente são utilizadas pomadas contendo concentrações alta de ureia, por exemplo, 40% de ureia, 20% de ureia com 10% de ácido salicílico, 40% de ureia com o antifúngico tópico bifonazol (1%). Elas são colocadas nas unhas sob oclusão por 1 a 2 semanas (BARAN; TOSTI, 2002; PANDHI; VERMA, 2012). Dessa forma, a parte doente da unha pode ser removida com o auxílio de um elevador e cortador de unha. O desbridamento é um procedimento onde há a retirada da unha por meio de corte, lixamento e abrasão (dispositivo de dermoabrasão ou lixa) (DI CHIACCHIO et al., 2003; MARKINSON; MONTER; CABRERA, 1997).

Vários tratamentos baseados em dispositivos estão atualmente sob investigação, como exemplo, os lasers. Eles se baseiam, segundo Gupta; Simpson (2012) no princípio da absorção seletiva da energia da luz, utilizando um comprimento de onda que atua sobre um cromóforo pertencente ao fungo e não sobre o tecido circundante. Dessa forma, são causados efeitos do tipo fotoquímicos, fototérmicos e fotomecânicos. O custo inicial de aquisição dos sistemas de laser e a falta de dados sobre sua eficácia em ensaios controlados, randomizados e controlados rigorosamente com avaliação micológica podem limitar a aceitação desses tratamentos. Isso torna difícil comparar os dados de eficácia com os de tratamentos já existentes (GUPTA; PAQUET; SIMPSON, 2013).

b) Terapia medicamentosa tópica

O uso de medicamento aplicados diretamente na unha (Figura 13), entre eles as pomadas, esmaltes medicamentosos, soluções, entre outros, são recomendados apenas para ONC superficial e menos grave. Apesar de seu alto custo, o tratamento geralmente é ineficaz, uma vez que a penetração do fármaco através da unha é baixa quando comparada com outros tecidos (CRAWFORD; HOLLIS, 2007; THOMAS et al., 2010).

Figura 13 - Aplicação tópica ungueal.



Na imagem à esquerda temos a aplicação na parte superior da unha, já na imagem à direita, aplicação sob a ponta da unha afetada.

Fonte: https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/label/2018/204427s006lbl.pdf

A queratina dura e a estrutura compacta/espessa da placa ungueal dorsal são fatores que atuam como uma barreira à difusão tópica do fármaco dentro e através da placa ungueal. A natureza hidrofílica da lâmina ungueal também impede a absorção da maioria das moléculas lipofílicas com alto peso molecular (AMEEN et al., 2014; STÜTTGEN; BAUER, 1982).

A fácil remoção de soluções tópicas e cremes podem prejudicar a liberação do fármaco para o tecido subungueal. Diante disso, tornou-se necessário, em virtude dos avanços tecnológicos, a introdução de esmaltes antifúngicos para tentar sanar tal problema (GUNT; KASTING, 2007). O esmalte é uma preparação farmacêutica que possui em sua formulação solventes orgânicos e resinas insolúveis em água os quais limitam a liberação transungueal do fármaco (SHIVAKUMAR et al., 2010). No entanto, os solventes orgânicos, evaporam após aplicação induzindo a precipitação do ativo. Isso impede que o fármaco difunda na lâmina ungueal.

Baseado no fato de que a água é um componente capaz de melhorar a plasticidade da unha, uma vez hidratada, a unha se torna mais permeável para aplicação de substâncias tópicas (GUNT; KASTING, 2007). Considerando isso, esmaltes baseados em água têm sido preferidos, pois promovem a hidratação da unha e a difusão do fármaco (SHIVAKUMAR et al., 2010).

Considerando então a aplicação e ação local proporcionado por estes produtos, os efeitos colaterais são minimizados, melhorando assim a adesão do paciente ao tratamento. Segundo Singal; Khanna (2011), as indicações para monoterapia tópica incluem:

1. Envolvimento limitado a 50% distais da lâmina ungueal, envolvimento de 3 ou 4 unhas;
2. Sem envolvimento da área da matriz;
3. Onicomicose branca superficial (SWO);
4. Em crianças com unhas finas e de crescimento rápido;
5. Como profilaxia em pacientes com risco de recorrência;
6. Pacientes em que a terapia oral é inadequada.

Agentes tópicos clássicos como a amorolfina e o ciclopirox já são de uso bem consolidados, enquanto terapia tópica, e inclusive bastante citados na literatura científica para o tratamento de ONCs (CRAWFORD; HOLLIS, 2007). A amorolfina pertence à classe das morfolinas (REINEL, 1992) e é responsável por inibir duas etapas na via de biossíntese do ergosterol, a 14 α -redutase e a 7,8D-isomerase as quais atuam na regulação da fluidez da membrana. Essa inibição leva a atividades fungistáticas (inibição do crescimento celular) e fungicidas (morte celular) contra dermatófitos, fungos não dermatófitos e leveduras (HAY et al., 2018; POLAK, 1988). O esmalte contendo 5% do ativo encontra-se disponível no mercado nacional e internacional e é recomendado no tratamento de ONCs sem envolvimento da matriz e casos leves de onicomicose subungueal distal e lateral que afetam até duas unhas (LECHA et al., 2005; SINGAL; KHANNA, 2011).

O ciclopirox é um quelante derivado da hidroxipiridona com atividade antifúngica de amplo espectro contra as espécies de *T. rubrum*, *S. brevicaulis* e *Candida*. O ciclopirox inibe processos enzimáticos dependentes de metais, por conta da sua alta afinidade por cátions trivalentes como Fe³⁺ (íon férrico) (HAY et al., 2018). Esses íons são cofatores essenciais para enzimas como os citocromos. Como consequência de sua inibição, o ciclopirox prejudica o metabolismo microbiano, afetando os processos de transporte de elétrons mitocondriais durante a produção de energia, na absorção de nutrientes e degradação de peróxido intracelular tóxico (BOHN; KRAEMER, 2000). Está disponível no mercado nacional e internacional na forma de

esmalte a 8%, indicado para aplicação uma vez ao dia por até 48 semanas (AMEEN et al., 2014).

Além destes fármacos, os imidazólicos também são utilizados topicamente como o tioconazol. Ele é um antifúngico disponível em solução a 28% Trosyl® (Pfizer, Sandwich, U.K.). O tioconazol inibe o crescimento amplo de dermatófitos e leveduras (CLISSOLD; HEEL, 1986). Efeitos adversos das terapias orais levaram ao desenvolvimento de novos tratamentos para onicomicose, como o tavaborol e o efinaconazol (AMEEN et al., 2014). O primeiro foi recém-aprovado pelo *Food and Drug Administration* (FDA) como terapia tópica para onicomicose de unha causada por *T. rubrum* ou *T. mentagrophytes* (GUPTA; VERSTEEG; SHEAR, 2017a). KERYDIN® (Anacor Pharmaceuticals) se apresenta como solução de Tavaborol a 5%

Outro novo agente antifúngico que foi recentemente descoberto como sendo eficaz no tratamento da onicomicose é o efinaconazol comercializado em solução de a 10% (AMEEN et al., 2014). Vários tratamentos de onicomicose emergentes ainda não foram aprovados pela *Health Canada* ou pela FDA, mas exibem resultados preliminares promissores (GUPTA; SIMPSON, 2015; GUPTA; STUDHOLME, 2016a; GUPTA; VERSTEEG; SHEAR, 2017b).

3.2.3.2 Terapia sistêmica

Os antifúngicos orais usados para tratar onicomicose eram basicamente griseofulvina, terbinafina, azólicos incluindo cetoconazol, itraconazol e fluconazol (SINGAL; KHANNA, 2011). De acordo com Gupta; Paquet e Simpson (2013), Cetoconazol oral e griseofulvina não são mais usados para o tratamento de onicomicose. O cetoconazol, por exemplo, é responsável por gerar efeitos colaterais hepáticos graves (SINGAL; KHANNA, 2011). A principal linha de tratamento oral para onicomicose engloba fluconazol (FLZ), itraconazol (ITZ) e terbinafina (TBF) (GUPTA; PAQUET; SIMPSON, 2013).

Os antifúngicos azólicos inibem a síntese de ergosterol, reduzem a atividade enzimática ligada à membrana e interrompem a síntese de quitina, comprometendo membrana celular fúngica. O fluconazol (azólico) é altamente eficaz contra *Candida* e dermatófitos (SINGAL; KHANNA, 2011). É um fármaco que inibe a atividade enzimática das CYP3A4 e CYP2C9, sendo necessário um monitoramento rigoroso (ARRESE; PIÉRARD, 2003). Outro azólico antifúngico é o itraconazol o qual possui mais amplo espectro de atividade contra dermatófitos, *Candida* e FFND. Assim como o fluconazol também tem atuação sobre as enzimas das CYP,

ou seja, o itraconazol se liga ao sistema citocromo P450 3A4 e é responsável pela potencial toxicidade do itraconazol e interações medicamentosas (SREBRNIK et al., 2005).

Além do tratamento continuado (convencional), existe a pulsoterapia, ou seja, administração de altas doses do medicamento em uma curta duração de tempo (DE DONCKER, 1996; HAVU et al., 1997). Essa terapia em pulsos, por exemplo, já é aprovada pela FDA para o itraconazol apenas para o tratamento de ONCs (SINGAL; KHANNA, 2011). No Brasil, esse tratamento existe, inclusive com outros fármacos, sendo as dosagens diferentes a depender do local acometido (mão e/ou pé) (Tabelas 1 e 2).

Tabela 1- Dose e duração dos tratamentos sistêmicos contínuo e em pulsos para onicomicoses nas mãos.

Fármaco	Dose	Duração
FLZ	150mg/semana	Até cura clínica
ITZ	200mg/dia	6-12 semanas
	400mg dia/7d/mês	2-3 pulsos
TBF	250mg/d	6-12 semanas
	500mg dia/7d/mês	2-3 pulsos

Fonte: Adaptado de (RUIZ; CHIAICCHIO, 2005).

Tabela 2 - Dose e duração dos tratamentos sistêmicos contínuo e em pulsos para onicomicoses nos pés.

Fármaco	Dose	Duração
FLZ	150-300mg/semana	Até cura clínica
ITZ	200mg/d	12-24 semanas
	400mg dia/7d/mês	3-6 pulsos
TBF	250mg/d	12-24 semanas
	500mg dia/7d/mês	3-6 pulsos

Fonte: Adaptado de (RUIZ; CHIAICCHIO, 2005).

A terapia oral é recomendada para onicomicose subungueal proximal (quando pelo menos 50% da lâmina ungueal distal, matriz ungueal ou múltiplas unhas estão envolvidas) e para

pacientes cujas condições não responderam após 6 meses de terapia tópica (GUPTA; PAQUET; SIMPSON, 2013; IORIZZO; PIRACCINI; TOSTI, 2010).

Os tratamentos antifúngicos sistêmicos orais são geralmente mais eficazes do que os tratamentos tópicos; no entanto, eles também estão associados a maiores riscos de eventos adversos e interações medicamentosas. Os agentes orais, portanto, podem ser desaconselhados em pacientes polimedicados como idosos, imunocomprometidos, pacientes em diálise e receptores de transplante de órgãos (GUPTA; VERSTEEG; SHEAR, 2017a; JOHNSON et al., 2004).

Essas populações de maior risco geralmente usam tratamentos concomitantes para suas comorbidades e as interações medicamentosas com terapias antifúngicas podem provocar interações sinérgicas e/ou antagônicas (JOHNSON et al., 2004).

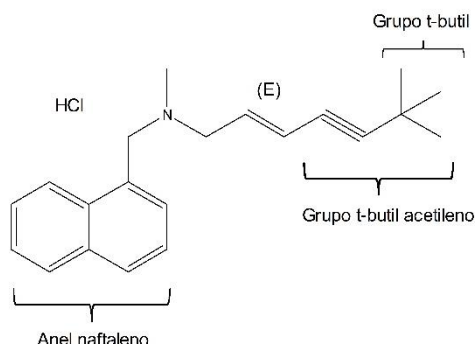
3.2.3.2.1 Terbinafina

Fármaco pertencente à classe das alilaminas, sendo o segundo membro da série a ser descoberto (GUPTA; SHEAR; TORONTO, 1997). Nas formulações, é comumente incorporado na forma de sal: O cloridrato de (E)-N-(6,6-dimetil-2-hepten-4-inil)-N-metil-1-naftalenometilamina ou também chamado de cloridrato de terbinafina (TB-HCl) (“Terbinafine hydrochloride | C₂₁H₂₆ClN - PubChem,” [s.d.]). Conforme verificado na Figura 14, a molécula apresenta um anel naftaleno substituído com cadeia lateral amina insaturada e grupo terminal t-butil.

O grupamento amina fornece à molécula caráter básico (ALBERTI et al., 2001; TANRIVERDI; ÖZER, 2013a). Em virtude da presença da dupla na cadeia alifática, a molécula pode ter a configuração cis ou trans. Percebeu-se que a cis apresenta atividade antifúngica significativamente menor se comparada ao seu correspondente isômero trans.

A configuração trans da ligação dupla é uma importante modificação estrutural para a atividade antifúngica. Outro grupamento importante é t-butilacetileno, porque, se comparado à naftifina (primeira alilamina descoberta), é responsável por aumento de 10 a 100 vezes na atividade *in vitro* e eficácia oral (STUETZ; PETRANYI, 1984; STÜTZ, 1987). A solubilidade é dependente do pH, diminuindo de 0,01 M em pH= 3 para $4,5 \times 10^{-6}$ M em pH= 9 (pKa = 6,7 ± 0,3) (DELGADO-CHARRO, 2012; UZQUEDA et al., 2010).

Figura 14 - Estrutura química do cloridrato de terbinafina (TB-HCl).



Atualmente, a terbinafina é o único antifúngico oral com atividade fungicida (AMEEN et al., 2014). O seu mecanismo de ação envolve a inibição irreversível da enzima esqualeno epoxidase que é essencial para a biossíntese de um componente da parede celular fúngica chamado ergosterol. A depleção do ergosterol resulta no efeito fungistático do fármaco e o acúmulo de esqualeno intracelular inicia uma cascata de eventos que resulta na atividade fungicida (ELEWSKI, 1993; VAN DUYN GRAHAM; ELEWSKI, 2011).

A terbinafina tem amplo e potente efeito fungicida contra dermatófitos, particularmente *T. rubrum* e *T. mentagrophytes*, mas tem menor atividade fungistática contra espécies de *Candida*, comparado aos azólicos (BUENO et al., 2009). Outros autores também citam alguns fungos filamentosos não dermatófitos (GUPTA; PAQUET; SIMPSON, 2013; LIPNER; SCHER, 2019).

Distribui-se extensivamente por todo o tecido adiposo, derme, epiderme e unhas por ser um fármaco altamente lipofílico e queratofílico ($\log P=3,3$) (BALFOUR; FAULDS, 1992; TANRIVERDI; ÖZER, 2013a). Ela sofre extensa biotransformação hepática, principalmente através da N-desmetilação e oxidação do grupo butil terciário (BALFOUR; FAULDS, 1992). Cerca de 99% da terbinafina se liga às proteínas plasmáticas, o que lhe confere maior tempo de meia vida plasmática e é eliminada principalmente pelos rins (AMEEN et al., 2014; DEBRUYNE; COQUEREL, 2001).

A terapia oral com terbinafina tem sido associada a insuficiência hepática, distúrbios do paladar e olfato, síndrome de Stevens-Johnson, sintomas depressivos, neutropenia grave e necrólise dérmica tóxica. Além disso, ela também é um inibidor da isoenzima CYP2D6. Antidepressivos tricíclicos, inibidores seletivos da recaptação de serotonina, antiarrítmicos da classe 1C, betabloqueadores e inibidores da monoaminoxidase são metabolizados por essa

mesma CYP. Isso confere graves interações medicamentosas (BALFOUR; FAULDS, 1992; GUPTA; PAQUET; SIMPSON, 2013; GUPTA; SHEAR, 1999).

A terbinafina é aprovada (Health Canada e FDA) para o tratamento de onicomicoses causadas por dermatófitos, com taxas de cura completa variando de 44% a 46% (GUPTA; VERSTEEG; SHEAR, 2017a). Segundo Schatz et al. (1995), em uma terapia oral diária de 250 mg, os níveis máximos de terbinafina quantificados na 18ª semana encontrados na unha são 0,52 e 1,01 µg/g para pacientes tratados durante 6 e 12 semanas, respectivamente. Após a suspensão do uso, o ativo ainda permanece detectável (0,28-0,19 µg/g) nas unhas por até 30 e 36 semanas para o tratamento de 6 e 12 semanas, respectivamente.

Apesar da terbinafina ter potencial terapêutico para tratamento por via oral, as interações medicamentosas e problemas como a insuficiência hepática são alguns dos fatores limitantes de seu uso. Alternativas tópicas podem vir a ser um tratamento de escolha em potencial, uma vez que efeitos sistêmicos adversos ou interações medicamentosas até o momento não foram evidenciadas na literatura (REPKA et al., 2002).

O Lamisil® (cloridrato de terbinafina a 1%), apresentado na forma de solução, spray e creme, são os únicos produtos industrializados comercializados. Ele é indicado, por exemplo, para o tratamento de pé de atleta (fungo). Até o momento, nenhum outro produto tópico à base de terbinafina encontra-se registrado, nem disponível no mercado para uso ungueal no tratamento de onicomicose. Nas farmácias magistrais brasileiras, é possível encontrar algumas formulações de terbinafina associadas ao fluconazol, onde ambos estão a uma concentração de 1 ou 2%.

Isso o torna, portanto, um fármaco inovador em potencial para novas formulações tópicas (“Safety and Pharmacokinetics of Terbinafine Hydrogen Chloride (HCl) Nail Lacquer in Patients With Onychomycosis - Tabular View - ClinicalTrials.gov,” [s.d.]; “Terbinafine hydrochloride | C21H26ClN - PubChem,” [s.d.]; VILLARS; JONES, 1989).

3.2.3.3 Terapia combinada

Na tentativa de melhorar a taxa de cura e reduzir a recidiva, o uso de terapia combinada tornou-se necessário (SINGAL; KHANNA, 2011). A utilização de medicamentos orais e tópicos combinados pode permitir a redução da dosagem oral, fornecer sinergia antimicrobiana, espectro antifúngico mais amplo com atividade fungicida aprimorada, suprimir mutantes resistentes e aumentar da tolerabilidade/segurança (AMEEN et al., 2014; POLAK, 1999). Os imidazóis tópicos, ciclopirox e amorolfina têm sido usados em combinação com os antifúngicos

orais (AMEEN et al., 2014). Além da terapia medicamentosa oral/tópica combinadas. Outros tipos de associações são citados por Ruiz e Chiacchio (2005) (Quadro 1).

Quadro 1- Outros tipos de associações de terapias combinadas.

- | |
|--|
| <ul style="list-style-type: none"> - Avulsão química + tratamento tópico - Avulsão mecânica / física + tratamento tópico - Avulsão química, mecânica / física ou cirúrgica + tratamento sistêmico - Avulsão química + tratamento tópico + tratamento sistêmico - Avulsão mecânica / física + tópico + sistêmico - Tratamento tópico + tratamento sistêmico - Tratamento sistêmico + tratamento sistêmico (sequencial) |
|--|

Fonte: RUIZ; CHIACCHIO, 2005.

3.3 MODELO DE LIBERAÇÃO E PERMEAÇÃO UNGUEAL

A anatomia das unhas onicomicóticas difere das normais. A onicomicose faz com que a placa possa engrossar, deformar, hiperqueratinizar, rachar, descolorir e até sofrer onicólise (NAIR; KIRAN VAKA; MURTHY, 2011; SCHER, 1996). O desenvolvimento de formulações, portanto, deve ser cuidadosamente pensado.

No que diz respeito aos estudos *in vitro*, o modelo mais utilizado é o uso do sistema de difusão de células verticais proposto por Franz (FRANZ, 1975). Neste sistema de células de difusão bicompartimental, pode-se utilizar tanto membranas sintéticas quanto biomembranas. As membranas separam o compartimento doador do compartimento receptor.

Os testes de liberação *in vitro* (IVRT) avaliam a capacidade de liberação do fármaco do veículo/formulação (FLORES *et al.*, 2018), já os testes de permeação *in vitro* (IVPT) utilizam biomembranas para avaliar a retenção bem como transporte do fármaco através dela (FRANZ, 1975, 1978).

Este último teste pode ser utilizado como preditivo do desempenho *in vivo* dos produtos tópicos após aplicação nas unhas. Eles também servem como um índice útil para comparar as formulações recém-desenvolvidos e auxiliar na otimização da composição dos produtos tópicos para as unhas (SHIVAKUMAR; REPKA; NARASIMHA MURTHY, 2014).

Visando prever a permeação dos agentes terapêuticos através da placa ungueal humana, várias biomembranas podem ser utilizadas, entre elas o casco bovino, recortes de unhas de voluntários saudáveis e unhas humanas obtidas de cadáveres.

Os cascos de animais fornecem uma alternativa à unha humana em estudos de permeação, mas, conforme Elkeeb et al. (2010), é preciso atenção no modelo e na extrapolação de dados visando prever a penetração ungueal humana *in vivo*. O motivo é devido ao fato de o casco ser mais permeável do que a unha humana.

As proteínas do casco têm ligações dissulfeto significativamente mais baixas em comparação com a placa ungueal humana (BADEN; KUBILUS, 1983; ELKEEB et al., 2010). Além disso os cascos são capazes de absorver e reter mais água do que a unha humana, em virtude da menor quantidade de queratina (ELKEEB et al., 2010; MERTIN; LIPPOLD, 1997).

Para avaliar as formulações transungueais, as unhas sadias humanas são bastante utilizadas como modelos *in vitro* (SHIVAKUMAR et al., 2012). Elas são previamente colocadas em imersão na água ou outro meio antes do teste a fim de facilitar a montagem. Por ser uma biomembrana relativamente rígida, um adaptador, como Permegear[®] (Figura 15a), é necessário para acoplá-la entre as câmaras doadora e receptora das células de difusão (Franz) (Figura 15b).

Para que haja a difusão do fármaco, existem fatores que influenciam no transporte transungueal: O tamanho molecular e a polaridade do fármaco, carga superficial, natureza e pH do veículo (SHIVAKUMAR et al., 2012). No tocante ao tamanho, é sabido que moléculas menores penetram bem através da placa ungueal quando comparado às maiores (MURDAN, 2002).

Além disso a densa e tortuosa rede de queratina é responsável por gerar o atrito nas moléculas, ou seja, à medida que o tamanho molecular aumenta, a taxa de penetração diminui. Geralmente, as moléculas que excedem 300 Dalton em tamanho podem enfrentar obstáculos ao permear a placa ungueal (SHIVAKUMAR; REPKA; NARASIMHA MURTHY, 2014).

Figura 15 - Adaptador de unhas Permeagear® (A) e Célula de difusão de Franz vertical com o adaptador (B).



Fonte: a autora.

O coeficiente de partição do fármaco é outro parâmetro que influencia na difusividade das moléculas. Estudos como o de Walters; Flynn (1983) demonstraram que, o aumento da cadeia carbônica (lipofilicidade) de álcoois homólogos, resultou na diminuição da permeabilidade. Essa relação, porém, não ocorreu em álcoois de cadeias maiores, como o dodecanol. Ao invés de diminuir, a permeação aumentou. Apesar do baixo teor de lipídios na lâmina ungueal, acredita-se que essa via lipídica parece ser importante para a passagem de substâncias muito hidrofóbicas como essa (MURDAN, 2002).

A carga que o fármaco possui é um fator que determina sua difusão e interação com a lâmina ungueal. Assim como o ativo, a unha também pode vir a possuir carga e a principal responsável por este fato, é a queratina. Com um ponto isoelétrico ($pI \sim 5,0$), a queratina apresenta uma carga positiva quando expostas a pH menor que 5, e apresenta carga negativa quando em pH superior a 5,0. Dessa forma, os semelhantes se repelem. A interação eletrostática entre a superfície carregada da unha e a carga superficial dos íons em difusão é denominada “efeito Donnan” (SHIVAKUMAR et al., 2012).

É importante salientar que as moléculas geralmente têm que estar no estado solúvel e não ionizado para permear através da placa ungueal. Ao mesmo tempo, a quantidade de fármaco que permeia através da placa ungueal está relacionada com atividade termodinâmica no veículo. Com base nisso, os solventes aquosos e lipofílicos são considerados ideais, respectivamente, para fármacos lipofílicos e hidrofílicos, respectivamente. O pH do veículo aquoso e pK_a do fármaco determinam a extensão da ionização, ou seja, sua solubilidade aquosa. O que se prevê,

então, é que os fármacos ácidos sejam bem transportados em valores de pH baixos, enquanto os básicos em valores de pH mais altos (SHIVAKUMAR et al., 2014; MURDAN, 2008).

3.4 PROMOTORES DE PERMEÇÃO

Como exposto anteriormente, a unha humana é basicamente dividida em três partes principais: matriz, leito e lâmina ungueal. A matriz representa a principal parte viva do tecido epidérmico proliferativo e o leito é uma fina membrana epitelial com vasos linfáticos onde a placa ungueal se adere. A lâmina ou placa ungueal é a barreira física da unha (ALBARAHMIEH et al., 2019). Ela consiste em cerca de 80-90 camadas de células queratinizadas mortas e estão fortemente conectadas por ligações de enxofre, dando a rigidez (ALBARAHMIEH et al., 2019; SHAH; JOBANPUTRA, 2018).

É importante que esse tecido tenha certa rigidez, já que é responsável por proteger a matriz e o leito ungueal (DE BERKER, 2013; SHAH; JOBANPUTRA, 2018). No entanto, a lâmina ungueal densamente queratinizada e a espessura da unha representam grandes desafios no sucesso do tratamento tópico (BROWN et al., 2009; MURTHY; MAIBACH, 2012).

Diante desses obstáculos, houve a necessidade de explorar novas estratégias para atender à exigência de retenção e permeação transungueal, a fim de melhorar a eficácia da terapia tópica: o uso de promotores de permeação que são divididos em dois grandes grupos; o químico e o físico.

3.4.1 Promotores químicos

De uma maneira geral, os promotores químicos atuam principalmente promovendo a hidratação/intumescimento da placa ungueal. Dessa forma, há o aumento da porosidade da lâmina, ou seja, isso facilitaria a difusão do agente permeante transungueal (GUNT; KASTING, 2007; NOGUEIRAS-NIETO et al., 2011). Mercaptanos/tióis e agentes queratinolíticos são grandes representantes de promotores químicos.

Mercaptanos/tióis (compostos contendo um grupo sulfidril) são os intensificadores de permeação transungueal mais eficazes, se comparado aos outros. Por meio da ruptura das ligações bissulfeto na queratina, eles promovem o amolecimento e intumescimento da placa ungueal (CHOUHAN; SAINI, 2012; KOBAYASHI et al., 1998; SHIVAKUMAR et al., 2012).

As alterações da lâmina ungueal causadas pelos mercaptanos são irreversíveis, ou seja, as características estruturais da unha são perdidas. Ácido tioglicólico, N-acetilcisteína, N-(2-

mercaptopropionil) glicina, 2-mercaptoetanol e piritona são exemplos de compostos tióis usados como potenciadores (SHIVAKUMAR et al., 2012).

Agentes queratolíticos, como ureia e ácido salicílico, também promovem amolecimento/intumescimento da placa ungueal (HAO; SMITH; LI, 2008; MURDAN, 2002), mas através da desnaturação da queratina. O uso de um único agente queratolítico resulta em nenhum ou pouco aumento de permeação transungueal (ELSAYED, 2015; QUINTANAR-GUERRERO et al., 1998). No entanto, uma combinação de dois queratolíticos ou um mercaptano com queratolítico provavelmente funcionam sinergicamente (ELSAYED, 2015; MALHOTRA; ZATZ, 2002; SHIVAKUMAR et al., 2012). Isso é evidenciado, por exemplo, na associação da ureia com N-(2-mercaptopropionil) glicina, onde percebeu-se o aumento da permeação de água transungueal (SHIVAKUMAR et al., 2012).

A água também é considerada um promotor de permeação (SHIVAKUMAR et al., 2012). Apesar de fazer parte da constituição da unha (10–30%), a água também atua na hidratação da unha deixando-a entumecida. A unha, quando hidratada, irá se comportar como um hidrogel, possuindo uma rede de poros aquosos por onde as moléculas podem permear (HAO; SMITH; LI, 2008; MURDAN, 2002).

Outros compostos têm sido investigados como potencializadores de permeação transungueal. O peróxido de hidrogênio-uréia (UHP), um agente oxidante, que age semelhantemente aos agentes queratolíticos: Aumenta a permeação transungueal, ao potencializar o efeito dos mercaptanos e ineficaz quando usados isoladamente (BROWN et al., 2009; ELSAYED, 2015).

Outros intensificadores de penetração encontrados na literatura são N-metil-2-pirrolidona, polipropilenoglicol 400, dimetilsulfóxido (DMSO), labrasol, mercaptoetanol, transcitol. Todos foram testados utilizando cascos bovinos (SHIVAKUMAR et al., 2012).

As enzimas queratolíticas também são agentes químicos promotores e são conhecidas por hidrolisar a matriz de queratina da lâmina ungueal alterando suas propriedades de barreira e aumentando a permeação através da unha (ELKEEB et al., 2010; MOHORČIČ et al., 2007). A enzima queratinase isolada do fungo *Paecilomyces marquandii* é um exemplo (MOHORČIČ et al., 2007).

3.4.2 Promotores físicos

Como citado anteriormente, além dos promotores químicos existem os físicos. Segundo Shivakumar *et al.* (2012) os métodos físicos são: abrasão da superfície da placa ungueal, lasers pulsados, microporação, ultrassom de baixa frequência e Iontoforese.

A) Abrasão

A unha é composta por três camadas: dorsal, intermediária e ventral. A camada mais externa (dorsal) é considerada a principal barreira para a penetração do fármaco (SHIVAKUMAR *et al.*, 2012). O uso de abrasivos, como a lixa, é o método mais simples de remoção da camada superior da lâmina ungueal (REPKA *et al.*, 2002). Ela é uma ferramenta estética, mas também encontrada em muitos kits de esmaltes medicinais, como o Loceryl®.

Além da lixa, existe uma outra forma de abrasão mais agressiva: os equipamentos elétricos. Eles geram desbridamento vigoroso da superfície da lâmina. De Berker (2009) cita que tal abrasão aumenta taxa de sucesso da terapia tópica para diferentes afecções ungueais.

As brocas odontológicas também têm se mostrado benéfica na clínica para melhorar a eficácia do tratamento tópico (SHIVAKUMAR *et al.*, 2012). A abrasão mais incisiva é necessária, a depender do caso. No estudo de Sumikawa *et al.* (2007) foi necessário reduzir a espessura ungueal dos pacientes em virtude do espessamento consequente da onicomicose.

B) Microporação

O PathFormer® (PathScientific, Carlisle, EUA) é um dispositivo aprovado pelo FDA para trepanação controlada das unhas, ou seja, realiza furos nas unhas e permite o controle preciso da profundidade. Ele é utilizado para drenagem de hematomas subungueais (Figura 16) (SALTER *et al.*, 2006). É um dispositivo que funciona por meio do princípio da diferença da resistência elétrica.

A placa ungueal é altamente queratinizada já o leito possui teor de água maior. A presença da queratina e da água configuram à placa e leito, respectivamente, alta e baixa resistência elétrica. À medida que os furos se aprofundam, tornam-se mais próximos do leito e a resistência diminui. Dessa forma o dispositivo utiliza a resistência elétrica do leito como um *feedback* para que broca pare e retraia (Figura 17) (CIOCON *et al.*, 2006; SHIVAKUMAR *et al.*, 2012). Isso torna o procedimento vantajoso, porque também elimina a necessidade de anestesia. No estudo clínico realizado por Boker *et al.* (2007), o PathFormer® foi utilizado como ferramenta física de permeação por conta da capacidade de promover a poração.

Figura 16 - Antes e depois da drenagem do hematoma.



Fonte: Salter *et al.* (2006).

Além do PathFormer® outros equipamentos estão sendo utilizados, visando essa estratégia de microporação. Chiu *et al.* (2015) usaram em seu estudo um dermaroller (*In finitive Beauty, Birmingham, UK*). Ele possui agulhas de titânio (bem resistentes) e foi utilizado com a finalidade de melhorar a permeação de nanopartículas.

Figura 17- PathFormer®.



Fonte: SALTER *et al.* (2006).

C) Ultrassom de baixa frequência, laser pulsado e iontoforese

O ultrassom tem a capacidade de gerar cavitação (formação e colapso de bolhas de gás), quando aplicadas em um líquido. O colapso violento de muitas bolhas de gás no líquido resulta em ondas de choque, que propagam e impactam em qualquer membrana presente (MITRAGOTRI; KOST, 2004; MURDAN, 2008).

Como promotor físico, testes foram realizados com cascos bovinos (usados como placas ungueais modelo) (TORKAR; KRISTL; MURDAN, 2007). Embora o mecanismo de ruptura da membrana ainda não tenha sido elucidado, as pressões assimétricas e impactos de microjatos

líquidos gerados pelo colapso de bolhas próximo à membrana podem gerar esse acesso (MURDAN, 2008).

Lasers pulsados são outra possível alternativa física, porém a sua eficácia *in vivo* na permeação transungueal ainda não foi estabelecida. A energia que o laser produz é a ferramenta de acesso a unha, ou seja, a queratina absorve-a, o calor gerado é difundido, gerando remoção das camadas ungueais (NEEV et al., 1997; SHIVAKUMAR et al., 2012).

A iontoforese envolve a aplicação de uma pequena corrente elétrica em uma membrana biológica, como a unha, para aumentar o transporte molecular (DELGADO-CHARRO, 2012). O aumento do transporte iontoforético de fármacos na unha tem sido atribuído à eletrorrepulsão e permeabilização da membrana (MURTHY; WISKIRCHEN; BOWERS, 2007; SHIVAKUMAR et al., 2012).

É importante ressaltar que esse aumento é influenciado pelo pH do veículo, a força iônica do tampão e a densidade. Estudos *in vivo* realizados por James; Graham; English (1986) já faziam uso dessa técnica sendo implementada nas unhas e pele. Esse método tem sido aplicado em outras situações clínicas, como tratamento de hiperidrose, tratamento de herpes simples (ELKEEB et al., 2010; KASSAN; LYNCH; STILLER, 1996). A utilização mais refinada dessa técnica permitiu a criação de adesivos e aparelhos de medição, inclusive aprovados pelo FDA. O GlucoWatch® (medição iontoforética de glicose em diabéticos) e LidoSite® (adesivo iontoforético tópico de lidocaína HCl/epinefrina) são exemplos de produtos aprovados.

3.5 FORMAS FARMACÊUTICAS TÓPICAS

Como citado anteriormente, os tratamentos tópicos atuais têm eficácia limitada, possivelmente devido ao fármaco não conseguir atravessar a placa ungueal e/ou o veículo não ser capaz de transportar uma quantidade terapeuticamente suficiente de ativo para erradicar a infecção (KUMAR; MURALIDHARAN; DHANARAJ, 2012; HUI *et al.*, 2002). Sendo assim, os sistemas de liberação de fármacos para infecções fúngicas na área ungueal têm sido amplamente estudados nos últimos anos. Dentre eles, podemos citar a microemulsão, cristal líquido e termogel.

a) Microemulsão

As microemulsões (MEs) têm sido intensamente estudadas nas últimas décadas devido ao seu grande potencial em muitas aplicações entre elas, farmacêuticas (KUMAR; MURALIDHARAN; DHANARAJ, 2012).

Trata-se de um sistema de liberação de aspecto líquido não viscoso, transparente, de comportamento newtoniano, opticamente isotrópico e termodinamicamente estável, pois seu tamanho de gotícula varia entre 10 a 100 nm e não coalescem (LAWRENCE; REES, 2000; BAROT et al., 2012; McCLEMENTS, 2012; SCHULMAN; STOECKENIUS; PRINCE, 1959).

As MEs são compostas de óleo, surfactante/co-surfactante e água em proporções específicas, onde, por meio de um diagrama fase pseudoternário, é feita a relação entre sua composição e o comportamento de fase dessas diferentes misturas (MONTENEGRO et al., 2016).

Cada vértice do diagrama, em formato triangular, irá representar a fase aquosa, a oleosa e a mistura binária de tensoativo/co-tensoativo.

A microemulsão atua como um carreador coloidal de liberação de ativos oncomicóticos e é uma preparação de alta capacidade de solubilização para fármacos hidrofílicos e lipofílicos (HEUSCHKEL; GOEBEL; NEUBERT, 2008). Dessa forma, é importante garantir que as proporções dos componentes estejam dentro dos limites do diagrama.

Além disso, a formulação também tem o fator clinicamente benéfico devido à sua versatilidade, biocompatibilidade, capacidade de favorecer a penetração de fármacos em camadas profundas da unidade ungueal devido às propriedades únicas de hidratação dos componentes da microemulsão bem como a vida útil mais longa da formulação (AGRAWAL et al., 2021).

b) Cristal Líquido

O cristal líquido (CL) é uma fase da matéria entre sólido cristalino e líquido, ou seja, é a fase de transição e também denominada mesofase. Por conta disso, o cristal líquido possui um pouco das características de ambos estados. Possui tanto certa ordem posicional e orientacional do estado sólido, como também mobilidade e fluidez característicos do estado líquido (SINGH, 2000; MÜLLER-GOYMAN, 2004).

A descoberta é atribuída ao botânico austríaco Friedrich Reinitzer (1888). O cientista observou que um material conhecido como benzoato de colesterila possuía dois pontos de fusão (BECHTOLD, 2005; REINITZER, 1888). A partir disso, buscava-se entender mais sobre a

existência dos CLs desde aspectos como transições de fase, forças intermoleculares e interfaciais até para as aplicações tecnológicas na indústria.

Sabe-se que os CLs sofrem rápidas mudanças de orientação ou transições de fase quando exposto a mudanças de temperatura, pressão, pH, hidratação e concentração de íons inorgânicos (BECHTOLD, 2005; SINGH, 2000). Essas são algumas das características importantes necessárias para formular cristais líquidos.

À nível de formulação é importante saber que há uma grande família dos CLs chamados liotrópicos. Trata-se de misturas de moléculas anfifílicas e solventes que, em determinadas condições de temperatura, pressão e concentração apresentam a formação de superestruturas – agregados moleculares – que se organizam no espaço, exibindo algum grau de ordem (HO et al., 1996; GUO et al., 2010).

São compostos por um solvente e uma molécula anfifílica. Dessa forma podem se organizar, podendo formar mesofases do tipo cúbica, hexagonal ou lamelar. Essas propriedades são ideais para organismos (RAJABALAYA, et al.2017). Inclusive sendo de interesse em estudos para formulações com intuito transdérmico e até mesmo ocular (RAJABALAYA et al.2017; GAN et al., 2010).

A administração tópica de cosméticos e produtos farmacêuticos envolve uma variedade de formulações diferentes, das quais sistemas com carreador coloidal de fármacos são atualmente de particular interesse (MÜLLER-GOYMANN, 2004).

Devido os cristais líquidos possuírem como característica de serem promotores de absorção e também propriedades reológicas que conferem bioadesão (GUO, et al. 2010) são interessantes para esse novo nicho farmacêutico voltado para formulações ungueais.

c) Termogel

Trata-se de uma forma farmacêutica, onde um de seus constituintes é um polímero, o qual permite à formulação a característica de termorreversibilidade. Dessa forma, por meio da mudança de temperatura, há a transição do estado sol para gel (CABANA et al., 1997; MAITRA; SHUKLA,2014). Comumente as formulações são preparadas à temperatura ambiente e a conversão se dá à temperatura corporal (cerca de 36°C).

É importante salientar que essa temperatura de transição do estado sol-gel varia inversamente com a concentração do polímero na solução, ou seja, quanto menor a temperatura de transição de estado físico, maior a concentração utilizada (VINTILOIU; LEROUX, 2008; WANKA et al., 1990).

Dito isto, é importante notar que a concentração do polímero adicionado na formulação é crucial. À critério de exemplo, o Poloxâmero 407 em uma concentração entre 10-25% é suficiente para apresentar o comportamento termossensível (RICCI et al., 2005; DE LIMA et al, 2018). Essa conversão ocorre devido a agregação das moléculas de P407 em forma micelar, seguido de geleificação (DUMORTIER et al., 2006; WANKA et al., 1990).

No que se refere a preparações tópicos ungueais, o termogel de poloxamer já foi utilizado em formulações de TB-HCL para tratamento de onicomicoses. Apesar da formulação tópica ser preferível ao tratamento oral, a barreira da unha é um importante obstáculo que ainda impossibilita a alta e rápida taxa de penetração do fármaco, atrelado também a insuficiente quantidade de ativo mantida durante o período de tratamento, provavelmente, em sua maioria, encontra-se precipitado (REICHL et al., 2013).

O poloxamer 407, um componente do termogel, em concentrações entre 20 e 40% em água formam estruturas cúbicas de face centrada e em concentrações mais altas (50%), observa-se um empacotamento cúbico de micelas centrado no corpo (LIU; CHU, 2000; DUMORTIER et al., 2006). Em ambas organizações estruturais produzem dissolução lenta dos géis, rigidez parcial e alta viscosidade. Tais propriedades facilitam a incorporação de fármacos hidrofílicos e hidrofóbicos. Segundo KRACHT e MÜLLER-GOYMANN (2020), formulações à base de poloxamer 407 apresentaram resultados promissores em um modelo de placa ungueal infectada.

Isso corrobora com o fato de que o desenvolvimento das formulações termogéis são promissoras quanto ao tratamento de onicomicoses, já que, além de todos os fatores citados acima, seu alto teor de água também auxilia na permeação do ativo (TÄUBER; MÜLLER-GOYMANN, 2014).

4 METODOLOGIA

4.1 MATERIAIS

Foi utilizado Cloridrato de Terbinafina (TB-HCl) – lote: 20H13-B022-066301, FAGRON; Transcutol P, Miristato de Isopropila; Polietilenoglicol 400; Tween® 20 (*Polyoxyethylene sorbitan monolaurate*); Span® 80 (*Sorbitane monooleate*); Tween® 80 (*Polyoxyethylene sorbitan monooleate*); Acetato de etila; Álcool cetosteárilico; Lanette N (*Sodium cetearyl sulfate*); Polawax NF (*Polysorbate 60*); Álcool Etílico; Kolliphor® EL; Poloxamer 407; Propilenoglicol; Álcool isopropílico; Hidróxido de Potássio; Ureia; Hidroxipropilmetilcelulose; Cloreto de sódio; Cloreto de potássio; Fosfato de sódio; Fosfato de potássio; Azida sódica; Ácido oléico; Metanol e Acetonitrila grau HPLC (LiChrosolv®); BRIJ®20 (*Polyoxyethylene 20 oleyl ether*), Croda, East Yorkshire, UK. As vidrarias foram previamente calibradas.

4.2 EQUIPAMENTOS

Os seguintes equipamentos foram utilizados: Banho Dubnoff (modelo Q226M, Quimis); Agitador microplacas (modelo MA562, Marconi); Pipetas automáticas, (Modelo Research plus, Eppendorf); Banho Ultrassom (modelo SSBu, SP Labor); pHmetro (modelo PG 2000, GEHAKA); Equipamento ZetaSizer® Nano-ZS90 (Malvern®Instruments, UK) e Cromatógrafo líquido HPLC série 1100 Agilent®, com detector de comprimento de onda variável (DCV).

4.3 REVISÃO SISTEMÁTICA

Vislumbrando a obtenção de dados sistematizados para a execução deste projeto, foi realizada uma revisão sistemática da literatura, a partir pergunta norteadora “Com base em estudos de permeação ungueal, as formulações de Terbinafina desenvolvidas para aplicação nas unhas apresentam-se promissoras?”. A questão de pesquisa foi construída por meio da aplicação da estratégia PICO, um acrônimo para *Population of interest* (população ou problema), *Intervention* (intervenção), *Comparator* (comparador) e *Outcome* (desfecho). A população/problema foi definida como “baixa permeação e retenção da terbinafina em tratamentos tópicos para onicomicoses”, a intervenção como “aplicação de formulação tópica

contendo terbinafina em estudos de permeação/retenção ungueal”, a comparação considerada como “comparação entre formulações tópicas do mercado (creme para aplicação na pele) e formulações comerciais em esmalte contendo fármacos diferentes (ciclopírox ou amorolfina)” e optou-se pela não restrição dos desfechos.

A busca foi realizada nas seguintes bases de dados eletrônicas: PubMed, Scopus, ScienceDirect, Cochrane e SciELO. Com objetivo de controlar o vocabulário da busca, os termos para pesquisa foram selecionados de acordo com os descritores do MeSH, todos em inglês. Os termos “Onychomycosis” e “terbinafina” foram fixados e combinados com “nails”, “topical” e “in vitro techniques”, resultando em oito combinações para a busca. O operador booleano “AND” foi utilizado para limitar os artigos encontrados aos que continham todos os termos pesquisados concomitantemente.

Após a busca inicial nas bases de dados escolhidas, os artigos repetidos foram excluídos, e em seguida foi realizada uma leitura exploratória de títulos e resumos, desta forma, os estudos em potencial foram selecionados através de critérios de inclusão e exclusão. Foram consideradas elegíveis as publicações que tratavam de unhas, onicomicoses, terbinafina e estudos *ex vivo* de permeação/retenção ungueal. Foram incluídos apenas artigos em inglês ou português; que foram publicados entre 2010 e 2020. Foram excluídos artigos não disponíveis na íntegra, bem como cartas, capítulo de livro, comentários e revisões bibliográficas.

Na próxima etapa, as publicações selecionadas, após a leitura crítica de títulos e resumos, foram lidas e analisadas na íntegra. Foram excluídos os artigos que não realizavam ensaios *in vitro* com unhas humanas (doadas ou de cadáveres) ou cascos bovinos; que efetuaram apenas ensaios *in vivo*; que não empregavam a célula de difusão de Franz ou quaisquer outras células modificadas e os que não avaliavam parâmetros de retenção e/ ou de permeação ungueal. Em seguida, foram extraídas as seguintes informações: ano de publicação, país, produtos comerciais empregados, formulações desenvolvidas e testadas, tipo de biomembrana utilizada (unhas humanas, cascos bovinos), se houve pré-tratamento, quantidade de produto/formulação aplicada, tempo total de estudo, frequência de aplicação, informações sobre a célula utilizada, resultados de permeação, retenção e fluxo.

4.4 ESTUDO DE SOLUBILIDADE DO CLORIDRATO DE TERBINAFINA

Pensando no planejamento racional de novas formulações contendo cloridrato de terbinafina (TB-HCl), sua solubilidade em diferentes tensoativos, óleos, solventes e misturas de solventes foi avaliada.

A solubilidade do fármaco foi determinada pela adição de TB-HCl em excesso (300mg) a 1mL de solventes puros (Cremophor EL, Tween® 20, Ácido oleico, Álcool isopropílico, Propilenoglicol, Miristrato de isopropila, Transcutol P, Glicerina e Água), bem como misturas binárias e ternárias (Tabela 3) diferentes meios

Tabela 3 - Composição das misturas de solventes (em percentual).

Solventes	Mistura (%)					
	A	B	C	D	E	F
Água ultrapura	-	-	-	37,5	25	18,75
Álcool isopropílico	50	50	50	31,25	37,5	31,25
Propilenoglicol	-	50	-	31,25	37,5	31,25
Transcutol® P	50	-	-	-	-	-
Tween® 80	-	-	50	-	-	-
Acetato de etila	-	-	-	-	-	18,75

Fonte: a autora.

As dispersões formadas foram homogeneizadas por agitação em banho maria (Dubnoff Microprocessado, Quimis®) a uma temperatura de $32 \pm 2^\circ\text{C}$, por um período de 72 horas e, em seguida, centrifugadas a 20000 rpm por 10 minutos, após isto uma alíquota do sobrenadante foi retirada, filtrada em filtro de seringa ($0,45 \mu\text{m}$) e diluída em fase móvel. A concentração do fármaco foi determinada por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplada ao detector de arranjo de diodos (CLAE-DCV).

4.5 DESENVOLVIMENTO DAS FORMULAÇÕES UNGUEAIS DE CLORIDRATO DE TERBINAFINA

4.5.1 Desenvolvimento dos diagramas de fase pseudoternários

Para determinar as faixas de concentração dos componentes para o desenvolvimento de Microemulsões (MEs), foram construídos diagramas de fase pseudoternários usando o método adaptado da titulação de água (YUTANI et al., 2016). Neste estudo, a titulação foi realizada com álcool isopropílico/água (2:1). Como par de surfactante/co-surfactante (Smix) foi utilizado Cremophor EL e Tween® 20 que foram misturados em proporções de peso de 1:5 e 5:1. As razões de ácido oleico para (Smix) foram feitas em 1:9, 2:8, 3:7, 4:6, 5:5, 6:4, 7:3, 8:2 e 9:1. Posteriormente, as misturas foram avaliadas visualmente e a fase de ME foi identificada como a região no diagrama de fases em que foram obtidas formulações transparentes e fluidas (PATEL et al., 2013).

A solubilidade do TB-HCl nas microemulsões selecionadas foi realizada para conhecer a saturação do fármaco em cada formulação e decidir a concentração do fármaco a ser incorporado nas formulações. Neste procedimento, um excesso de TB-HCl foi adicionado às MEs placebo e os sistemas foram agitados em vórtex por 5 min. O restante do procedimento foi o mesmo descrito para o estudo de solubilidade.

4.5.2 Desenvolvimento de Termogéis e preparação de cristal líquido

Com base na solubilidade encontrada de TB-HCl nas misturas binárias e ternárias (Tabela 10), os termogéis foram desenvolvidos. Para preparar a formulação, Poloxamer®, que é o agente gelificante desta preparação, foi inicialmente adicionado à mistura água/álcool isopropílico. Em seguida, foi adicionado o propilenoglicol e a preparação foi mantida em refrigeração por 24 horas a uma temperatura de 22°C para completa solubilização do polímero. Por fim, os demais constituintes e o fármaco foram incorporados à formulação.

Ademais, TB-HCl foi também incorporado em um sistema líquido cristalino (Tabela 12), cujo desenvolvimento foi também realizado pelo nosso grupo de pesquisa (dados não publicados). A microscopia de luz polarizada (DM750P, Leica®) foi utilizada para avaliar a isotropia ou anisotropia do sistema.

4.6 CARACTERIZAÇÃO DAS FORMULAÇÕES

Após o desenvolvimento, as formulações foram mantidas a $25 \pm 2^\circ\text{C}$ e foram caracterizadas quanto suas características organolépticas, determinação de pH e doseamento do fármaco. Para os sistemas microemulsionados, além dessas análises, foram realizadas a determinação do tamanho de gotícula, potencial zeta e avaliação por microscopia de luz polarizada. Todas as análises foram realizadas, no mínimo, em triplicata e os resultados apresentados por média $\pm$ desvio padrão (DP).

4.6.1 Determinação do pH

Para a determinação do pH das formulações desenvolvidas, o pHmetro modelo PG 2000 (GEHAKA) foi utilizado, previamente calibrado com as soluções tampão de pH 7,0 e pH 4,0 a $25,0 \pm 0,5^\circ\text{C}$ (BRASIL, 2008).

4.6.2 Doseamento de Cloridrato de Terbinafina nas formulações desenvolvidas

Para doseamento do TB-HCl nas formulações desenvolvidas, uma alíquota foi transferida para um tubo tipo Falcon de 15 mL e adicionado uma solução extratora (SE) de água: acetonitrila (55:45). Para as formulações ME2 com 2 e 5%; TG com 2 e 4%; e TGKA com 2 e 4%, foi adicionado 10 µL para um volume total de 10mL da SE. No caso da ME5 com 7% de TB-HCl, os mesmos 10 µL foram completados para 14mL da SE. Para o cristal líquido, uma quantidade de 0,01g foi adicionado para 10mL da mesma solução.

Essas misturas foram ao vórtex por 1 minuto e em seguida foram mantidas por 30 minutos no banho ultrassom. As amostras foram filtradas e quantificadas por CLAE-DCV.

4.6.3 Determinação do tamanho das gotículas e potencial zeta das microemulsões

A determinação do tamanho de gotícula, bem como o potencial zeta das microemulsões foram realizados com auxílio do equipamento ZetaSizer® Nano-ZS90 (Malvern® Instruments, UK), a partir da técnica de Espalhamento Dinâmico de Luz. Todas as amostras foram analisadas com diluição 1:10 em água, exceto a ME 5 7% E (1:200), devido a presença do espessante.

4.6.4 Microscopia de luz polarizada

As microemulsões desenvolvidas, bem como o cristal líquido, foram observadas através do Microscópio de Luz Polarizada (DM 750P – Leica®) para avaliar a isotropia ou anisotropia dos sistemas.

4.7 MÉTODO DE QUANTIFICAÇÃO POR CROMATOGRAFIA LIQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA COM DETECTOR DE COMPRIMENTO DE ONDA VARIÁVEL (CLAE-DCV)

As análises foram realizadas usando um HPLC série 1100 Agilent® equipado com um detector de comprimento de onda variável (DCV). Água + 0,012M de trietilamina (TEA) + 0,02M de ácido fosfórico (A) e ACN (B), foram utilizados como fase móvel em modo isocrático (55:45). Foi utilizada uma coluna cromatográfica Gemini C18 (150 x 4,6 mm 5µ), fluxo de 1 mL/min, volume de injeção de 10 µL. O fármaco foi detectado em 224nm. O tempo total de análise foi de 6 minutos e o tempo de retenção para cloridrato de terbinafina (TB-HCl) foi de

aproximadamente 4,9 minutos. Os dados foram obtidos usando o software Agilent ChemStation®. O método CLAE-DCV para TB-HCL foi parcialmente validado seguindo as diretrizes da RDC nº 166/2017 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) para métodos analíticos e bioanalíticos, respectivamente, seguindo os parâmetros seletividade, linearidade, exatidão e precisão.

A Seletividade do ensaio foi verificada a partir da avaliação da fase móvel; MeOH + 0,1% de ácido fórmico; tampão fosfato + 0.8% de Tween® 80; branco de unha humana e solução de extração de unha (etanol: água 70:30), em comparação com uma solução padrão de TB-HCL (5 µg/mL). No caso de branco de unhas humanas, 3 amostras de unhas de diferentes doadores foram cortadas em pequenos pedaços com tesoura e colocadas em microtubos de 2mL, foram adicionados 200µL de uma mistura etanol: água (70:30) e estes foram agitados em banho termostático de 37°C. Após 24h, 800µL da mesma mistura foram adicionados e agitados por mais 1 hora em mesa agitadora, seguido de filtração (0,45 µm) e quantificado por CLAE-DCV.

Os limites de detecção (LD) e quantificação (LQ) foram calculados baseado na extrapolação da faixa de trabalho estudada, foram utilizadas as seguintes equações matemáticas, respectivamente:

$$LD=(3,3*Desvio_padrão_resíduos) / (coeficiente angular)$$

$$LQ=(10*Desvio_padrão_resíduos) / (coeficiente angular)$$

A linearidade do método foi verificada nas concentrações de 0,5; 2; 5; 10; 20; 50µg/mL em MeOH + 0,1% de ácido fórmico. Para avaliar o resultado da linearidade, foi utilizado o método dos Mínimos Quadrados Ordinários com aplicação do teste F da ANOVA para avaliação do coeficiente angular com nível de significância de 5%. A análise da dispersão foi realizada aplicando o teste Shapiro-Wilk para avaliação da distribuição dos resíduos. Já a homoscedasticidade foi realizada pelo teste de Cochran para avaliar a normalidade da distribuição dos resíduos.

A precisão foi realizada em dois níveis: repetibilidade onde as amostras foram avaliadas sob as mesmas condições de operação, mesmo analista e mesma instrumentação, em uma única sequência analítica para determinação de 6 réplicas da concentração do teste, individualmente preparadas. E pela precisão intermediária: onde as amostras foram avaliadas no mesmo laboratório, em dois dias diferentes, e por dois operadores distintos (A e B). As análises contemplaram a mesma concentração e o mesmo número de determinações descritas na avaliação da repetibilidade.

Para avaliar a repetibilidade foi feita uma análise descritiva através do cálculo da média, desvio padrão e desvio padrão relativo, onde este último foi fixado em 5%, já para a comparação dos resultados entre dias e analistas foi aplicada uma análise de variância (ANOVA) com nível de significância de 5%.

A exatidão foi realizada de forma similar à precisão, para avaliarmos uma recuperação de 100%. Foi estabelecido um limite inferior de 90% e um limite superior de 110%, os dados foram analisados com um nível de significância de 5%. Todas as análises estatísticas foram realizadas através do programa *Action Stat* Versão 3.7

4.8 ESTUDOS DA CINÉTICA DE LIBERAÇÃO *IN VITRO*, PERMEAÇÃO *EX VIVO* E RETENÇÃO UNGUEAL DO CLORIDRATO DE TERBINAFINA

Para os estudos de liberação e permeação ungueal foram utilizadas células verticais de difusão de Franz sem adaptadores e com adaptadores de unha *PermeGear* para as células de Franz (*PermeGear, Inc., EUA*), respectivamente (Figura 18). Baseado no teste de solubilidade do TB-HCl possíveis meios receptores, foi utilizada solução tampão fosfato salino (PBS) + 0,8% de Tween® 80 (solubilidade da terbinafina = $5,11 \pm 0,32$ mg/mL) como líquido receptor.

No estudo de liberação foram utilizadas duas membranas artificiais hidrofóbicas, silicone e PTFE (politetra-fluoretileno). Já os estudos de permeação ungueal foram realizados com recortes de unhas humanas, obtidos de voluntários saudáveis após consentimento informado.

Figura 18 - Célula vertical de difusão de Franz.



Sem adaptador (A); com adaptador de unha (B).

Fonte: a autora.

4.8.1 Obtenção, preparo e avaliação microscópica das amostras de unha humana

Os recortes de unhas humanas deveriam ter pelo menos 8 mm de comprimento, tamanho necessário para montar a unha no adaptador de unhas para as células de Franz (PermeGear, Inc., EUA), onde será realizado o ensaio de permeação ungueal. As unhas foram doadas por voluntários saudáveis após consentimento informado. A aprovação ética foi concedida pelo Comitê de Ética em Seres Humanos da Universidade Federal de Pernambuco, CAAE: 27554719.1.0005208 (Anexo I). As doações foram feitas em laboratório e os recortes de unhas foram mantidas congeladas a -20°C.

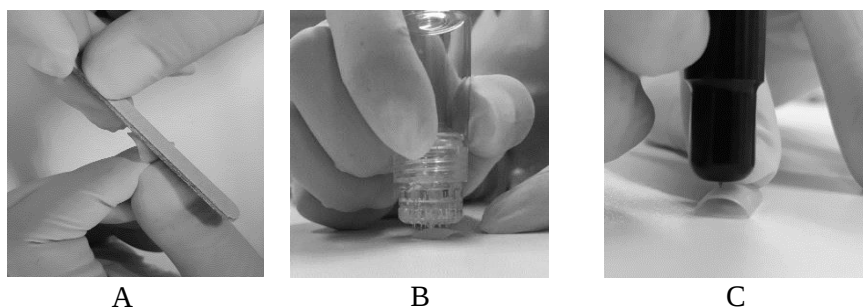
Para codificação de cada unha, foram utilizadas as letras iniciais dos dados da doação: numeração do doador, mão (esquerda ou direita) e o número relacionada a cada dedo (1, 2, 3, 4 e 5) contados do dedo mínimo ao polegar. Antes de serem utilizados para testes de permeação e teste microbiológico, as unhas armazenadas foram descongeladas, hidratadas e submetidas a três tratamentos físicos, a fim de investigar sua ação como promotores de permeação física.

O primeiro tratamento da unha foi apenas lixar (não porada (NP)) as unhas para trás e para frente um total de 5 vezes no lado dorsal da unha usando uma lixa de unha (Figura 19A).

O segundo tratamento da unha foi lixar as unhas da mesma forma descrita anteriormente, seguida de microporação (MP) com agulhas de titânio comercialmente disponíveis de 0,60mm de comprimento (Hydra.needle®) por cinco vezes, conforme mostra a Figura 19B, produzindo um total de aproximadamente 20 fissuras na área de difusão.

O terceiro tratamento das unhas foi lixar as unhas da mesma forma descrita acima, seguido da criação de microcanais laterais (MC) utilizando lâmina comercial (*Tungsten Blades*) com offset de 0,60mm projetada para Vinyl Cutter (Figura 19C). Um total de 12 canais lado a lado foram feitos à mão.

Figura 19 - Lixamento de unhas (A), microporação (B) e realização de microcanais (C).



Fonte: a autora.

Para avaliar a profundidade dos microcanais formados com lâmina comercial (Tungsten Blades) (terceiro tratamento), em triplicata, as unhas foram cortadas ao meio e colocadas verticalmente no suporte do criostato com o lado cortado para cima. O emblocamento foi realizado em gel (Tissue-Tek® O.C.T.™ Compound by Sakura), congelado e cortado em criostato (Leica CM1860UV, Leica Microsystems, Wetzlar, Alemanha) a -27°C . Foram obtidas 5 seções, a partir de cortes transversais seriados, dois a dois, com espessura de $7\mu\text{m}$. No mesmo dia, as lâminas foram observadas em microscópio de fluorescência (Leica DMI4000 B, Alemanha), com objetiva de 20x. As unhas foram fotomicrografadas e as medidas de espessura e profundidade dos canais foram avaliadas usando o software ImageJ (National Institutes of Health).

4.8.2 Montagem do sistema manual de células verticais de difusão de Franz para os estudos de liberação e permeação

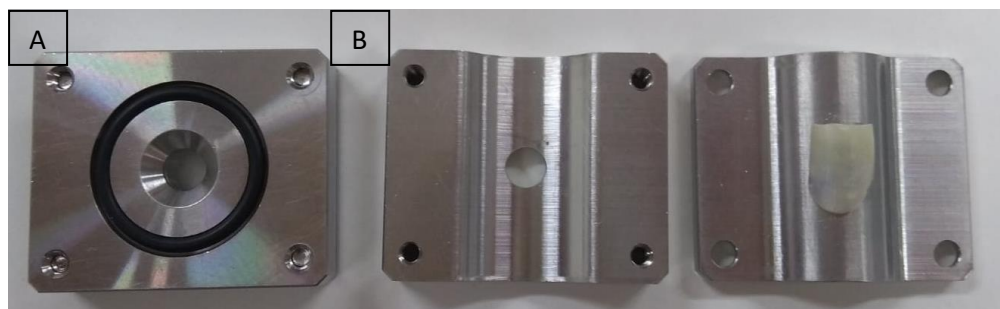
Na montagem do sistema de células de difusão de Franz para realizar os estudos de liberação foram utilizadas duas membranas diferentes: uma membrana de elastômero de silicone sintético (Dow Corning® 7-4107), de $0,75\mu\text{m}$ de espessura e uma membrana hidrofóbica de PTFE ($0,45\mu\text{m}$ de tamanho de poro) obtida da Filtrilo Ltd. Millipore®.

A liberação de TB-HCl das formulações foi realizada utilizando uma célula de difusão vertical (PermeGear Inc. Bethelhem, PA, EUA, área de difusão = $0,65\text{ cm}^2$). O compartimento receptor foi preenchido com 5mL de PBS + 0,8% de Tween® 80 (solubilidade da terbinafina = $5,11 \pm 0,32\text{ mg/mL}$) garantindo condições *sink* durante todo o experimento. O líquido receptor (0,5 mL) foi coletado em 5, 10 e 20 minutos e 0,5, 0,75, 1, 2 e 4 h, e substituída por meio receptor fresco. As amostras foram filtradas e analisadas por CLAE-DCV. Foram aplicados 10 μL das formulações com 2, 4, 5 e 7% de TB-HCl (equivalente a aproximadamente 0,31, 0,62, 0,77, 1,08 mg/cm^2 de TB-HCl, respectivamente). O sistema foi mantido sob agitação magnética (300 rpm) (Fisatom 713d, Fisatom, Brasil).

Para os estudos de permeação ungueal foram utilizados adaptadores de unha (PermeGear Inc. Bethelhem, PA, EUA, área de difusão = $0,196\text{ cm}^2$) (Figura 20) acoplada à célula de difusão de Franz. A superfície dorsal da unha foi colocada voltada para o compartimento doador e a superfície ventral ficou em contato com o compartimento receptor preenchido com 5mL de PBS 7,4 + 0,8% de Tween® 80 contendo 30mg/L de azida sódica para prevenir o crescimento microbiano. As condições *sink* foram garantidas durante todo o experimento. No dia do

experimento, as unhas foram embebidas em água deionizada por um período de 2 horas antes dos tratamentos físicos citados no item 4.8.1.

Figura 20 - Adaptador ungueal PermeGear para as células de Franz (A) e montagem da unha no adaptado (B).



Fonte: a autora.

O primeiro ensaio de permeação envolveu aplicação de múltiplas doses das formulações e unhas após o primeiro tratamento (MD-NP). Neste caso, 10 μ L das formulações com 2, 5 e 7% de TB-HCl (equivalente a aproximadamente 1,02; 2,55 e 3,57 mg/cm^2 de TB-HCl respectivamente) foram aplicados a cada 24 horas. A superfície da unha foi limpa com dois cotonetes secos Johnson's® antes da aplicação da nova dose.

O segundo ensaio envolveu uma aplicação de dose única e unhas após o segundo tratamento (SD-MP). Neste caso, 50 μ L das formulações com 2, 4, 5 e 7% de TB-HCl (equivalente a aproximadamente 5,10; 10,20; 12,75 e 17,86 mg/cm^2 de TB-HCl respectivamente) foram aplicados uma vez no início do experimento.

O terceiro ensaio envolveu uma dose única e unhas após o terceiro tratamento (SD-MC). Neste caso 50 μ L das formulações com 2, 4 e 7% de TB-HCl (equivalente a aproximadamente 5,10; 10,20 e 17,86 mg/cm^2 de TB-HCl respectivamente) foram aplicados uma vez no início do experimento.

Em todos os experimentos o doador foi ocluído com Parafilm®; as células foram incubadas a $32 \pm 1^\circ\text{C}$ durante 14 dias e o receptor agitado magneticamente (IKA®). 0,5 mL da solução receptora foram amostrados após 7 dias e no final dos experimentos (14 dias). As amostras foram filtradas (Millipore® 0,45 μ m) e analisadas pelo método descrito anteriormente (CLAE-DCV).

Uma avaliação adicional foi realizada para o segundo teste de permeação (SD-MP). Ao final do experimento, 3ml de líquido receptor (LR) foram coletados de cada célula de difusão. Em capela de fluxo laminar, os LRs foram filtrados através de filtros estéreis com tamanho de

poro de 0,22 μm (PVDF) e 50 μL foram colocados em placas de Petri (em quadruplicata) para ensaio microbiológico, seguido de incubação em estufa a 25°C. Após 7 e 15 dias, verificou-se a formação de halo de inibição no meio contaminado. O percentual de inibição foi calculado como a área do halo de inibição em relação à área total de crescimento potencial. A área de inibição foi estimada como a de um círculo com o diâmetro medido com um Paquímetro Digital (0-150 mm) e a área total de crescimento do fungo foi de 153 cm^2 em todos os casos. As placas de Petri foram preparadas adicionando 2,5mL de suspensão fúngica de *T. rubrum* (isolado clínico da coleção interna, fornecido pelo Laboratório de Micologia Médica Sylvio Campos do Centro de Biociências – CB/UFPE; cód. URM 6206) em solução salina (de acordo com as diretrizes do CLSI M28-A2) e 50mL de meio de ágar *sabouraud*. Após a solidificação do meio (~15 minutos), foram feitos poços no centro da placa com o auxílio de um cilindro oco de aço inoxidável (0,5cm de diâmetro) para a aplicação do LR.

4.8.3 Avaliação de retenção ungueal

Ao final de todos os experimentos de permeação, as unhas foram retiradas dos adaptadores e limpas duas vezes com um swab embebido com álcool isopropílico (Bio-Soma®, Lote: LM033B17) para remoção total da formulação residual. A região circular central demarcada pela área de difusão de cada unha foi recortada, a espessura avaliada com auxílio de paquímetro digital (150mm-ZAAS); pesada, e cortada em pequenos pedaços que foram colocadas em um eppendorf com 200 μL de solução de extração (etanol:água 70:30), os eppendorfs foram agitados por banho termostático de 37 °C por 24h, e então outros 800 μL do líquido de extração foram adicionados e agitados por mais 1 hora. Em seguida, as soluções foram filtradas e analisadas por método previamente validado (CLAE-DCV).

4.9 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIFÚNGICA TÓPICA A PARTIR DE MODELO *IN VITRO*

O método descrito por Sleven et al. (2015), com pequenas modificações foi utilizado conforme Figura 21. Todo material utilizado foi autoclavado a 121°C por 15 minutos antes da montagem do sistema. As unhas previamente hidratadas (2h) foram lixadas, microporadas (MP) e higienizadas com swab de álcool isopropílico (Biosoma®). As formulações utilizadas foram TG 2%, TG 4%, TGKA 2%, TGKA 4%, ME5 7%, ME5 7% E e CL 2%.

O seguinte procedimento de montagem foi realizado em uma capela de fluxo laminar. A extremidade inferior de um frasco de vidro (Vial Sigma-Aldrich®) foi cortada para que pudesse ser utilizada como “câmara doadora” para as formulações testadas; a unha foi montada na abertura (5 mm de diâmetro) da tampa do frasco de polipropileno com a face dorsal voltada para cima; um anel de borracha foi colocado na superfície ventral da haste para evitar vazamento e, em seguida, a tampa do vial foi rosqueada para vedação da unha no aparato (Figura 21A). O conjunto foi colocado em contato direto com ágar Sabouraud dextrose (SDA) que simulou o leito ungueal localizado no fundo de um frasco de vidro com tampa rosqueável de 200mL.

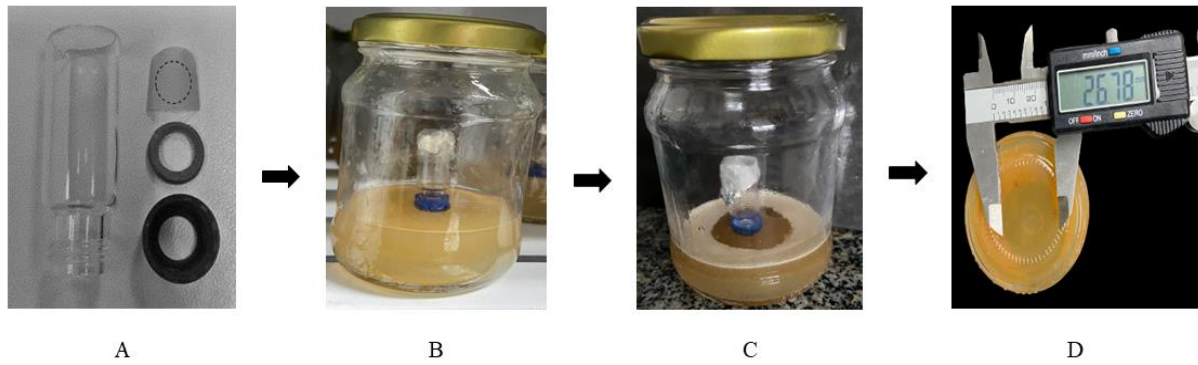
Para a etapa de pré-carga, uma dose única de 50 µL das formulações foi aplicada na superfície dorsal das unhas. Após incubação por 14 dias em estufa a $36,5 \pm 1^\circ\text{C}$, o conjunto frasco-unha foi transferido para meio de ágar Sabouraud dextrose (SDA) contaminado com suspensão padronizada (de acordo com as diretrizes do CLSI M27-A2) com *Candida albicans* (ATCC 90028) e *Candida parapsilosis* (ATCC 22019) (cepas fornecidas Laboratório de Microbiologia do departamento de farmácia da UFPE) conforme Figura 21B e mantidos por mais 7 dias, incubados em estufa a $36,5 \pm 1^\circ\text{C}$.

Em seguida, verificou-se a formação de halo de inibição no meio contaminado (Figura 21D). O percentual de inibição foi calculado como a área do halo de inibição em relação à área total de crescimento do fungo. A área de inibição foi estimada como a de um círculo com o diâmetro medido com um Paquímetro Digital, e a área total de crescimento do fungo que foi de $26,41 \text{ cm}^2$ em todos os casos.

Quando um halo de inibição foi formado, uma etapa adicional foi realizada para determinar se poderia ter ocorrido vazamentos. Para isso, ao final do experimento, o conjunto frasco-unha foi transferido para um novo ágar não inoculado e 400 µL de solução aquosa de azul de metileno 1% foram adicionados à câmara doadora e incubado por mais 7 dias (SLEVEN et al., 2015).

Nos casos em que não houve formação de halo, a unha foi limpa com swab e cortada em pequenos pedaços. Em uma parte das unhas foi realizado o exame micológico direto para avaliação visual de estruturas fúngicas, caso houvesse (DOS SANTOS; COELHO; NAPPI, 2002; LACAZ et al., 2002). A outra parte da amostra foi cultivada em ágar micosel para verificar se as estruturas visualizadas no exame direto estariam viáveis.

Figura 21 - Esquema do modelo *in vitro* adaptado de Sleven *et al.* (2015). (A): conjunto unha-frasco antes do fechamento, (B): conjunto unha-frasco colocado em SDA durante a etapa de pré-carga, (C): Conjunto unha-frasco após 14 dias em SDA com *Candida*, (D): Medição do halo pela base do frasco.



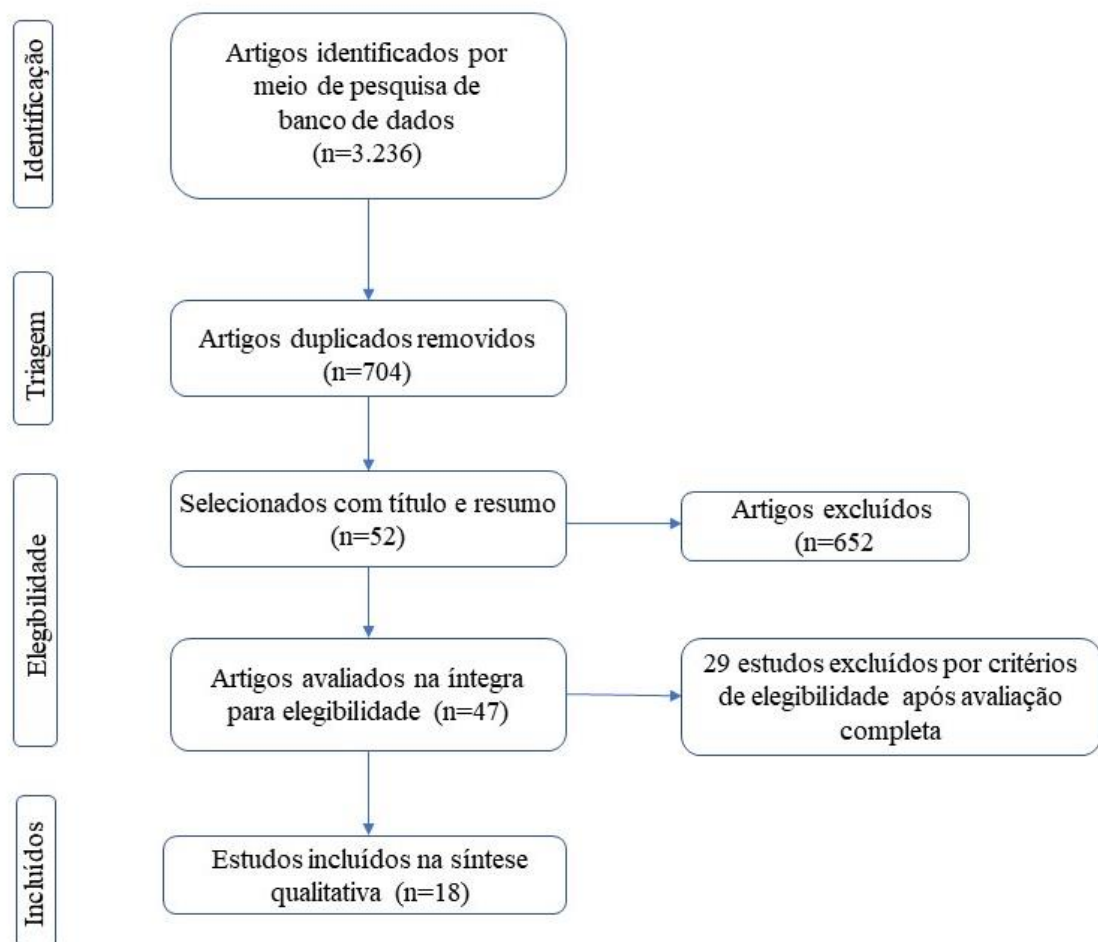
Fonte: a autora.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 REVISÃO DE LITERATURA

A busca nas bases de dados resultou em um total de 3.236 artigos, dos quais 2.532 se repetiram, restando 704 artigos. Após a leitura dos títulos, foram excluídos 652 artigos. Dentre os 52 artigos que foram selecionados para leitura na íntegra, obtivemos acesso a apenas 47 deles. Subsequente à avaliação crítica das publicações, com base nos critérios previamente descritos, foram selecionados 18 artigos (Figura 22).

Figura 22 - Esquema da seleção de artigos.

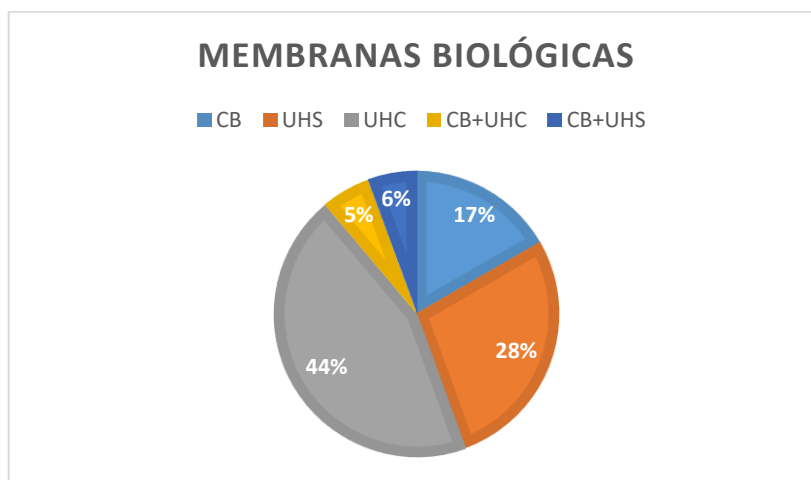


Fonte: a autora.

Após a leitura criteriosa de todos os artigos, a correlação dos resultados foi dificultada devido à falta de padronização dos diferentes parâmetros do procedimento de permeação, entre eles o tipo membrana biológica (Gráfico 1), o tempo total do experimento (entre 1 e 30 dias), a

concentração de fármaco presente em cada formulação (entre 1-10%) e, principalmente, a ausência de uma preparação farmacêutica para uso ungueal disponível no mercado nacional ou internacional contendo a terbinafina, a ser utilizada como padrão de comparação (BALFOUR; FAULDS, 1992; “Safety and Pharmacokinetics of Terbinafine Hydrogen Chloride (HCl) Nail Lacquer in Patients With Onychomycosis - Tabular View - ClinicalTrials.gov,” [s.d.]; “Terbinafine hydrochloride | C₂₁H₂₆ClN - PubChem,” [s.d.]; VILLARS; JONES, 1989).

Gráfico 1 - Distribuição dos tipos de membranas biológicas utilizadas nos trabalhos.



CB- Casco Bovino. UHS- Unha humana saudável. UHC- Unha humana de cadáver. CB+UHC- Casco Bovino + Unha humana de cadáver. CB+UHS- Casco Bovino + Unha humana saudável.

Fonte: a autora.

Todos os 18 artigos selecionados, utilizam o estudo de permeação *in vitro* (IVPT) para avaliar a passagem da terbinafina através do aparelho ungueal. Em 3 deles, as formulações desenvolvidas foram utilizadas para testar parâmetros de sistemas iontoforéticos como a corrente elétrica, tempo de incubação, presença de eletrólitos (AMICHAÏ et al., 2010; KUSHWAHA; SHIVAKUMAR; MURTHY, 2016; NAIR; KIRAN VAKA; MURTHY, 2011).

Como até o momento não existe nenhum medicamento seja em esmalte ou outra forma farmacêutica, aprovada, para uso ungueal com tendo terbinafina, dentre os 15 artigos restantes, em 4 deles, as formulações desenvolvidas foram comparadas com o creme comercializado para aplicação na pele contendo 1% de terbinafina (BAROT et al., 2012; ELSHERIF; SHAMMA; ABDELBAR, 2017; THATAI; SAPRA, 2017, 2018), em 2 deles com o esmalte comercializado contendo amorolfina 5% ou ciclopirox 8% (GREGORÍ VALDES et al., 2017; KERAÏ; HILTON; MURDAN, 2015), e em 1 outro, com uma solução preparada contendo 1%

da própria terbinafina. Neste último caso, o objetivo era avaliar a ação de alguns promotores de permeação (VEJNOVIC; HUONDER; BETZ, 2010).

Nos artigos avaliados, foi encontrada uma diversidade de formas farmacêuticas desenvolvidas entre elas esmaltes (CHOUHAN; SAINI, 2014), solução, géis, microemulsões, filmes (PATEL; VORA, 2016), lipossomas (SHAH; JOBANPUTRA, 2018), sistemas nanovesiculares, e adesivos dissolvíveis de microagulhas (ALBARAHMIEH et al., 2019). Na maioria dos estudos foi utilizada a célula de difusão vertical de Franz ou célula de difusão modificada. Vale salientar que a relação quantidade/área de produto aplicada foram muito diferentes, podendo ser consideradas tanto doses finitas quanto infinitas.

Considerando o país do primeiro autor de cada publicação, como o país de desenvolvimento do estudo, pode-se dizer que, de acordo com a Figura 23, a Índia foi o país com maior número de publicações na área de produtos ungueais contendo Terbinafina, distribuídas em cinco grupos de pesquisas diferentes. As 2 publicações da Turquia foram feitas por um único grupo de pesquisa e trata do melhoramento de formulações lipossomadas (TANRIVERDI; ÖZER, 2013a; TUNCAY TANRIVERDI et al., 2016) e as 2 publicações da Inglaterra são também de uma única equipe e relatam o uso de formulações de gel curável por UV (KERAI et al., 2018; KERAI; HILTON; MURDAN, 2015).

Figura 23 - Amplitude de publicações por países.



Fonte: a autora.

Dentre todos os artigos avaliados, chama a atenção a publicação de Hui et al., 2013, único trabalho onde foram utilizadas aplicações em doses múltiplas (período de 14 dias), uso de células *in line*, e uso do fármaco radiomarcado (HUI et al., 2013).

O estudo de permeação *in vitro* (IVPT) ungueal é o primeiro estudo a ser realizado após o desenvolvimento de uma formulação com o objetivo de selecionar formulações promissoras visando sua industrialização e uso futuro pela população. No entanto, muitas etapas a frente ainda devem ser realizadas em busca deste objetivo. Os testes de IVPT comparativos avaliados, demonstraram que todas as formulações desenvolvidas apresentam maior retenção na unha e/ou permeiam através da unha quando comparado com a formulação referência creme testada, contendo a terbinafina 1%. Nos demais trabalhos, as preparações desenvolvidas foram ditas serem promissoras, respondendo positivamente à pergunta norteadora do estudo.

Utilizando as publicações avaliadas como base para demonstrar as pesquisas realizadas na área ungueal utilizando a terbinafina, fica clara a necessidade de mais estudos em relação a este objeto de pesquisa, principalmente devido à ausência de formulações ungueais comercializadas atualmente com este fármaco.

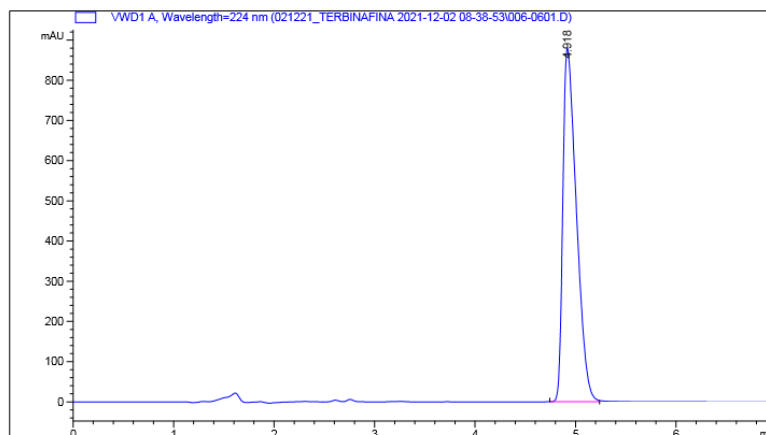
5.2 MÉTODO DE QUANTIFICAÇÃO POR CROMATOGRAFIA LIQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA COM DETECTOR DE COMPRIMENTO DE ONDA VARIÁVEL (CLAE-DCV)

O método analítico utilizado nesse trabalho foi baseado no método utilizado por Rizi et al. (2018) na quantificação de terbinafina em patches desenvolvidos para tratamento de onicomicose. Foi utilizada uma coluna cromatográfica de mesma dimensão, com fluxo e comprimento de onda para detecção, semelhantes a este descrito na literatura.

Mesmo assim, alguns testes foram realizados para melhor adaptar estas condições no nosso cromatógrafo. Mudanças na proporção entre o componente aquoso da fase móvel (A) e o componente orgânico (B) foram realizadas, e a melhor condição encontrada foi de 55:45, Água + 0,012M de trietilamina (TEA) + 0,02M de ácido fosfórico (A): ACN (B). Além disso, foi possível diminuir o volume de injeção relatado por Rizi et al., (2018) e padronizado em 10 µL.

O método utilizado para quantificação da Terbinafina (TB-HCl) mostrou seletividade, linearidade, precisão e exatidão de acordo com o especificado na Resolução RDC nº 166, de 24 de julho de 2017. O cromatograma apresentado na Figura 24, mostra o tempo de retenção do fármaco em aproximadamente 4,9 minutos. Os limites de detecção e quantificação foram 0,09 e 0,26 µg/mL, respectivamente para amostras em tampão fosfato + 0.8% de Tween® 80, calculados a partir do desvio padrão dos resíduos (4,3092) e do coeficiente angular (167,193).

Figura 24 - Cromatograma referente ao ponto 50 µg/mL.

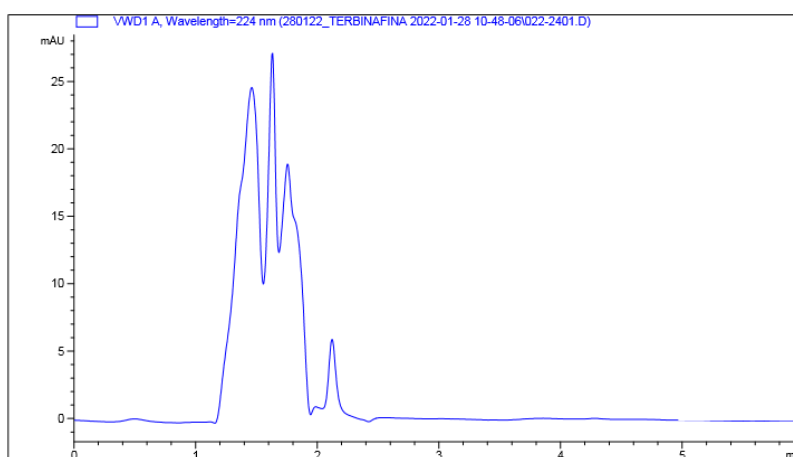


Fonte: a autora.

5.2.1 Seletividade

Quanto à seletividade, a análise das amostras de fase móvel; MeOH + 0,1% de ácido fórmico; tampão fosfato + 0.8% de Tween® 80 (Figura 25); branco de unha humana preparado conforme descrito em 4.7, e solução extratora de unha (etanol: água 70:30) não mostraram presença de pico interferente no tempo de retenção do TB, demonstrando que o método analítico apresenta seletividade para Terbinafina na presença destes meios testados.

Figura 25 - Cromatograma de tampão fosfato + 0.8% de Tween® 80.



Fonte: a autora.

5.2.2 Linearidade

Os resultados do estudo de linearidade foram avaliados quanto ao coeficiente angular, coeficiente de correlação, dispersão dos resíduos e homoscedasticidade dos dados, conforme descritos na RDC 166/17. A Figura 26 mostra o gráfico das respostas obtidas em função da concentração do fármaco e a Tabela 4 o resumo dos resultados das avaliações estatísticas com nível de significância de 5%. A equação da reta obtida pelo modelo é $y = 167,193 (164,604 - 169,782) + 8,639 (-5,658 - 22,937)$. A equação foi obtida pelo método com regressão $1/x$, visto que pelo método dos mínimos quadrados ordinários, o modelo não se mostrou homocedástico.

Tabela 4 - Resultados das avaliações estatísticas realizadas.

Teste	Conclusão
Teste F da ANOVA	Não rejeitamos a significância do modelo linear
Teste do intercepto	Intercepto igual a zero
Coefficiente de Correlação de Pearson	$R = 0.9991$ que é maior que o proposto (0,99)
Teste de Normalidade dos Resíduos	Não rejeitamos a hipótese de normalidade dos resíduos ($p_{\text{valor}} = 0,94871$)
Teste de Homocedasticidade	Modelo homocedástico ($p_{\text{valor}} = 0,5258$)

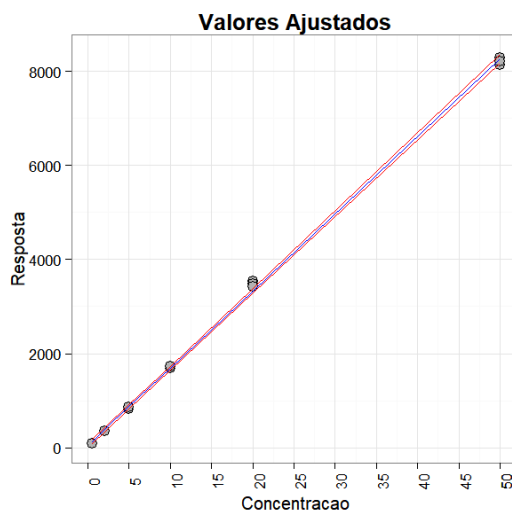
Fonte: a autora.

A análise do coeficiente angular teve como resultado um P-valor do teste F da ANOVA menor que 0,05 (conforme especificado), portanto rejeitamos a hipótese nula (coeficiente angular zero), mostrando que o modelo é linear. O coeficiente de correlação obtido (0.9991) é maior que 0.99 (especificado na legislação), concluindo que existe uma relação linear adequada.

A avaliação estatística da distribuição dos resíduos pelo teste de Shapiro-Wilk obteve um P-valor (0,94871) maior que 0,05, não rejeitamos a hipótese de normalidade dos resíduos ao nível de significância de 5%. E com P-valor (0,5258) obtido pelo teste de Cochram é maior que 0,05, não rejeitamos a hipótese de igualdade das variâncias ao nível de significância de 5%. Logo, temos um modelo homocedástico, que demonstra que existe variância constante dos erros experimentais.

Por fim, o método demonstra ser capaz de obter resultados analíticos diretamente proporcionais à concentração do fármaco nas amostras conforme demonstrado na Figura 26.

Figura 26 - Gráfico das respostas em função da concentração do TB.



Fonte: a autora.

5.2.3 Precisão e exatidão

Os resultados da precisão ao nível da repetibilidade estão descritos na Tabela 5. Os resultados encontram-se abaixo do especificado no método, que foi o valor de 5% para o DPR.

Tabela 5 - Resultados da Repetibilidade.

Nível Teórico (%)	Concentração obtida (µg/mL)
100	5,355
100	5,466
100	5,329
100	5,272
100	5,237
100	5,381
Média	5,34
Desvio Padrão	0,08
DPR (%)	1,53

Fonte: a autora.

Já os resultados experimentais e a estatística descritiva da precisão intermediária entre diferentes dias e diferentes analistas (A e B) estão descritos na Tabela 6. E a análise de variância, na Tabela 7. Os dados descritivos mostram que o maior DPR foi de 1,53%.

Tabela 6 - Dados experimentais da precisão intermediária (analista A e analista B).

Dia	Analista	Resposta	Concentração	Média	DP	DPR(%)
1	A	904,03	5,355	5,340	0,082	1,53
1	A	922,49	5,466			
1	A	899,63	5,329			
1	A	890,02	5,272			
1	A	884,15	5,237			
1	A	908,35	5,381	4,919	0,030	0,61
1	B	829,16	4,908			
1	B	824,66	4,881			
1	B	827,12	4,895			
1	B	834,07	4,937			
1	B	833,56	4,934	5,297	0,029	0,55
1	B	838,15	4,961			
2	A	901,19	5,338			
2	A	897,78	5,318			
2	A	889,94	5,271			
2	A	896,71	5,312			
2	A	889,54	5,269			
2	A	890,77	5,276	5,350	0,075	1,40
2	B	893,37	5,292			
2	B	892,89	5,289			
2	B	922,57	5,466			
2	B	911,37	5,399			
2	B	906,82	5,372	5,350	0,075	1,40
2	B	892,20	5,285			

Fonte: a autora.

Tabela 7 - Análise estatística aplicada da precisão intermediária.

	G.L.	Soma dos	Quadrados	Estatística	P-
		quadrados	Médios	F	Valor
Dia	1	6329,2172	6329,2172	0,6725	0,5627
Analista	1	5663,1122	5663,1122	0,6017	0,58
Repetitividade	20	1954,0883	97,7044		

Fonte: a autora.

Na análise estatística, para o nível de concentração estudado, obtivemos P-valor (0,5627) do teste da ANOVA maior que 0,05, não rejeitando a hipótese de que o efeito do fator Dia nulo ao nível de significância de 5%.

Da mesma forma, com P-valor (0,58) do teste da ANOVA maior que 0,05, também não rejeitamos a hipótese de que o efeito do fator Analista seja nulo ao mesmo nível de significância, ou seja, o método se mostrou preciso para os dois analistas nos dois diferentes dias testados.

Na avaliação da exatidão a variação admitida para o método foi de 90 a 110% ($\pm 10\%$), esta especificação foi determinada em função da heterogeneidade das matrizes analisadas, como as formulações desenvolvidas e as diferentes matrizes oriundas dos ensaios de liberação *in vitro* e permeação ungueal *ex vivo*.

Ademais, temos a complexidade de amostras biológicas, com a existência de um processo extrativo e a faixa linear de 0,5 a 50 $\mu\text{g/mL}$ com uma variação ampla de magnitude das concentrações.

Os resultados da exatidão e da análise estatística aplicada, estão demonstrados nas Tabelas 8 e 9, respectivamente. O método mostrou-se exato, visto que o intervalo de confiança para a média está contido dentro da margem de equivalência, concluímos que existe equivalência ao nível de significância de 5 %.

Tabela 8 - Dados experimentais da exatidão.

	Nível teórico	Resposta	Conc. Obtida	REC (%)
CQB	1	182.84	1.042	104.19
	1	185.04	1.055	105.50
	1	187.24	1.068	106.82
CQM	5	924.97	5.481	109.61
	5	915.81	5.426	108.52
	5	918.26	5.441	108.81
CQA	40	6640.12	39.664	99.16
	40	6666.06	39.819	99.55
	40	6722.86	40.159	100.40

Fonte: a autora.

Tabela 9 - Análise estatística aplicada da exatidão.

	Valores
Recuperação	104,7293
Desvio Padrão	4,1354
Graus de Liberdade	8
Limite Inferior	102,166
Limite Superior	107,2926
Limite Inferior (Especificação)	90
Limite Superior (Especificação)	110

Fonte: a autora.

5.3 ESTUDO DE SOLUBILIDADE DO CLORIDRATO DE TERBINAFINA

O desenvolvimento de qualquer tipo de formulação depende, primordialmente, das propriedades físico-químicas do fármaco, das características da via de administração (um direcionador para seleção da forma farmacêutica mais conveniente), bem como em virtude das características da patologia a ser tratada. Diante disto, a primeira etapa prática deste trabalho, foi a realização de um estudo padronizado de solubilidade do TB-HCl realizado com diferentes solventes simples, misturas binárias, ternárias e quaternárias (Tabela 10) visando obter subsídios para preparação das formulações microemulsionadas, termogeis e cristal líquido propostas.

Tabela 10 - Solubilidade de TB-HCl (média $\pm$ DP, n = 3) em uma série de solventes puros, misturas binárias, ternárias e quaternárias.

Componente	Solubilidade (mg/mL)
Cremophor EL	4,35 $\pm$ 0,37
Tween® 20	9,48 $\pm$ 2,11
Ácido oleico	6,08 $\pm$ 0,61
Álcool isopropílico	14,25 $\pm$ 3,28
Água ultrapura	4,37 $\pm$ 0,74
Transcutol® P	33,62 $\pm$ 0,52
Propilenoglicol	139,89 $\pm$ 37,00
Miristrato de isopropila	35,90 $\pm$ 1,46
Glicerina	9,48 $\pm$ 2,11
Álcool isopropílico / Transcutol® P 50:50 (p/p)	17,42 $\pm$ 1,17
Álcool isopropílico/ Propilenoglicol 50:50 (p/p)	30,60 $\pm$ 9,37

Álcool isopropílico/ Tween® 80 50:50 (p/p)	8,51 ± 2,18
Água ultrapura / Álcool isopropílico/ Propilenoglicol (37,5: 31,25: 31,25) (p/p/p)	37,12 ± 11,41
Água ultrapura / Álcool isopropílico / Propilenoglicol (25: 37,5: 37,5) (p/p/p)	50,19 ± 19,65
Água ultrapura / Álcool isopropílico / Propilenoglicol / Acetato de etila (18,75: 31,25: 31,25:18,75) (p/p/p/p)	137,08 ± 4,66

Fonte: a autora.

5.4 DESENVOLVIMENTO DAS FORMULAÇÕES UNGUEAIS DE CLORIDRATO DE TERBINAFINA

Com base na literatura consultada e considerando a baixa permeabilidade das placas ungueais a terapia tópica, decidimos partir para o desenvolvimento de 3 diferentes tipos de formas farmacêuticas, e incorporação do TB-HCl em diferentes concentrações. Para tanto, como sistemas simples foram preparados géis, e como sistemas mais complexos, as microemulsões e cristal líquido. Adicionalmente, em algumas delas, foram incorporados alguns outros excipientes, como promotores de permeação e agente alcalinizante (descritos na literatura científica como potencializadores na permeação) (THAPA et al., 2016).

5.4.1 Desenvolvimento dos diagramas de fase pseudoternários

Nas últimas décadas, numerosos estudos sugeriram que as microemulsões (ME) têm o potencial de aumentar a liberação cutânea de fármacos hidrofílicos e lipofílicos, em comparação com veículos convencionais (TABOSA et al., 2018). Eles podem proporcionar uma mudança na biodisponibilidade e diminuir a toxicidade dos fármacos, funcionando como reservatórios capazes de liberar fármacos e atingir tecidos e células específicos do organismo (SOUSA et al., 2017).

Neste trabalho, para preparar microemulsões, as diferentes proporções entre o par de tensoativos, óleo e fase aquosa permitiram caracterizar o domínio de pontos que promoveram a formação de um sistema homogêneo, claro e isotrópico, característico de ME. A área da região ME nos diagramas de fase foi expandida à medida que o percentual de tensoativos aumentou.

Três microemulsões (ME1, ME3, ME6) foram selecionadas utilizando a razão de tensoativos (Smix) Kolliphor/Tween® 20 (1:5) e mais três microemulsões (ME2, ME4, ME5) foram selecionadas usando a razão Kolliphor/Tween® 20 (5:1) (Tabela 11).

Tabela 11 - Composição dos sistemas microemulsionados.

Componente (%, p/p)	ME1	ME2	ME3	ME4	ME5	ME6
Ácido oleico	20	20	10	10	20	20
Cremophor EL	8,3	41,7	7,5	37,5	6,7	33,3
Tween® 20	41,7	8,3	37,5	7,5	33,3	6,7
Álcool isopropílico	20	20	30	30	26,7	26,7
Água ultrapura	10	10	15	15	13,3	13,3

Fonte: a autora.

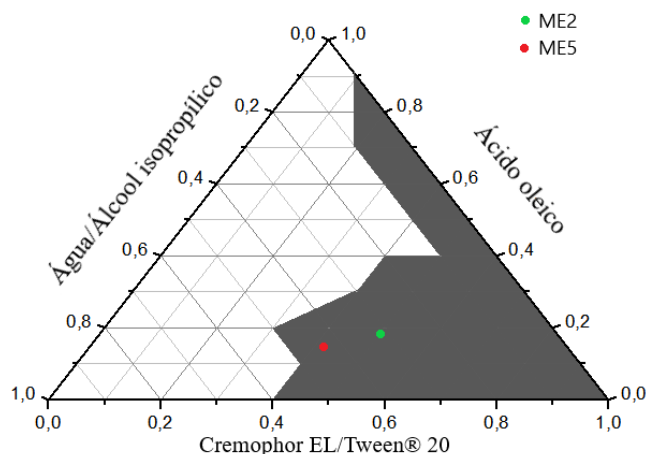
A saturação de TB-HCl nesses sistemas foi de $54,69 \pm 1,53$ (ME1); $72,86 \pm 5$ (ME3); $71,20 \pm 2,88$ (ME6); $51,31 \pm 3,48$ (ME2); $67,19 \pm 1,31$ (ME4); e $71,62 \pm 3,47$ mg/mL (ME5), respectivamente. Apesar da diferente solubilidade do TB-HCl no Kolliphor e no Tween® 20, não foi observada uma grande diferença na solubilidade deste fármaco nas MEs alterando o mesmo ponto do diagrama de 1:5 para 5:1 Smix.

Com base nos resultados de saturação de TB-HCl nas MEs, para incorporação do fármaco e dar sequência aos estudos, foram selecionadas as ME2 e ME5, com o menor e o maior valor de saturação. Ambos foram retirados do mesmo diagrama (Smix 5:1). A ME2 foi preparada contendo 2% e 5% de TB-HCl e ME5 contendo 7% de TB-HCl (Figura 27)

Os constituintes finais encontram-se na Tabela 12, e a caracterização física e química de MEs de TB-HCl no tempo 0 e após 6 meses foi demonstrada na Tabela 13. As formulações microemulsionadas não tiveram suas características modificadas após 6 meses de sua preparação.

À formulação ME5 contendo 7% do TB-HCL foi testada a incorporação de diferentes tipos de agentes geleificantes, entre eles o carbopol 934P, goma xantana, natrosol, Hidroxipropilmetilcelulose, carboximetilcelulose, agarose, goma guar e poloxâmer. A constituição da formulação selecionada encontra-se descrita na tabela 12.

Figura 27 - Diagrama de fase pseudoternário da região de existência dos sistemas microemulsionados (os pontos verde e vermelho estão correlacionados com ME2 e ME5, respectivamente).



Fonte: a autora.

5.4.2 Desenvolvimento de Termogeis e preparação de cristal líquido

Para o desenvolvimento das formulações geleificadas, diversos polímeros foram testados, entre eles vários derivados de celulose, o Carbopol ultrex e o Poloxamer®. Exceto o último polímero, nenhum deles mostrou-se compatível com o fármaco. Os constituintes das formulações de termogel e cristal líquido estão descritos na tabela a seguir.

Tabela 12 - Composição de todas as formulações desenvolvidas.

Componente (%, p/p)	ME 2 2%	ME 2 5%	ME 5 7%	ME5 7%E	TG 2%	TG 4%	TGKA 2%	TGKA 4%	CL 2%
Cremophor EL	40,87 %	39,615%	6,23%	6,06%	-	-	-	-	50%
Tween® 20	8,13%	7,885%	30,97%	30,14%	-	-	-	-	-
Ácido oleico	19,6%	19%	18,6%	18,1%	-	-	-	-	-
Água ultrapura	9,8%	9,5%	12,37%	12,04%	-	-	-	-	39%
Álcool isopropílico	19,6%	19%	24,83%	24,16%	-	-	-	-	-
Poloxamer®	-	-	-	2,5%	20%	20%	20%	20%	-

Água/ Álcool isopropílico/ Propilenoglicol (37.5: 31.25: 31.25)	-	-	-	-	78%	76%	-	-	-
Água/ Álcool isopropílico/ Propilenoglicol / Acetato de etila (18.75: 31.25:31.25:18.75)	-	-	-	-	-	-	76%	74%	-
Ureia	-	-	-	-	-	-	1%	1%	-
Hidróxido de potássio	-	-	-	-	-	-	1%	1%	-
Óleo de Licuri	-	-	-	-	-	-	-	-	9%
Cloridrato de Terbinafina	2%	5%	7%	7%	2%	4%	2%	4%	2%

Fonte: a autora.

5.5 CARACTERIZAÇÃO DAS FORMULAÇÕES

A Tabela 13 mostra os resultados de caracterização das formulações no dia 0 e seis meses após sua preparação (características organolépticas, pH, teor, tamanho de gotícula, potencial Zeta e isotropia ou anisotropia dos sistemas por microscopia de luz polarizada). Não foram encontradas mudanças significativas após 6 meses de preparadas e o teor de TB-HCl se encontra dentro do limite especificado para formulações tópicas (90-110%).

Tabela 13 - Características e estabilidade das formulações de microemulsionadas.

	Tamanho de gotícula (nm)	PDI	pH ^a	Potencial Zeta (mV) ^a	Teor do fármaco (%) ^a	Aspecto Macroscópico	Isotropia ou Anisotropia do sistema
Tempo	T0/6 meses	T0/6 meses	T0/6 meses	T0/6 meses	T0/6 meses	T0/6 meses	T0/6 meses
ME2 2%	176,07/ 182,07	0,22/ 0,25	3,27 ± 0,12/ 3,20 ± 0,22	23,73 ± 0,50 22,55 ± 0,51	98,86 ± 0,12/ 97,55 ± 0,22	Levemente amarelada	Isotrópico (não desvia luz polarizada)
ME2 5%	136,70/ 140,07	0,41/ 0,35	2,97 ± 0,14/ 3,07 ± 0,11	13,60 ± 0,26 14,13 ± 0,49	97,37 ± 0,55/ 98,12 ± 0,15	Levemente amarelada	Isotrópico (não desvia luz polarizada)
ME5 7%	165,97/ 170,55	0,28/ 0,22	2,90 ± 0,10/ 3,01 ± 0,25	16,27 ± 0,23 15,71 ± 0,33	97,30 ± 0,24/	Levemente amarelada	Isotrópico (não desvia

					96,55 ± 0,25		luz polarizada)
ME5 7%E	198,43/ 199,75	0,41/ 0,38	2,95 ± 0,11/ 3,05 ± 0,23	29,70 ± 0,1 29,06 ± 0,15	97,36 ± 0,25/ 96,58 ± 0,26	Levemente amarelada	Isotrópico (não desvia luz polarizada)
TG 2%	NA	NA	4,05 ± 0,21/ 3,99 ± 0,17	NA	98,35 ± 0,21/ 97,45 ± 0,22	Incolor translúcida	NA
TG 4%	NA	NA	4,10 ± 0,11/ 4,18 ± 0,16	NA	99,35 ± 0,35/ 98,10 ± 0,16	Incolor translúcida	NA
TGKA 2%	NA	NA	6,31 ± 0,19/ 6,28 ± 0,23	NA	98,87 ± 0,32/ 98,20 ± 0,18	Incolor translúcida	NA
TGKA 4%	NA	NA	5,84 ± 0,24/ 5,79 ± 0,19	NA	98,15 ± 0,31/ 98,00 ± 0,20	Incolor translúcida	NA
CL	NA	NA	3,12 ± 0,15/ 3,20 ± 0,08	NA	99,10 ± 0,23/ 98,75 ± 0,20	Incolor translúcida geleificada	Isotrópico (não desvia luz polarizada)

^aMédia ± desvio padrão, n = 3. NA= não se aplica.

Fonte: a autora.

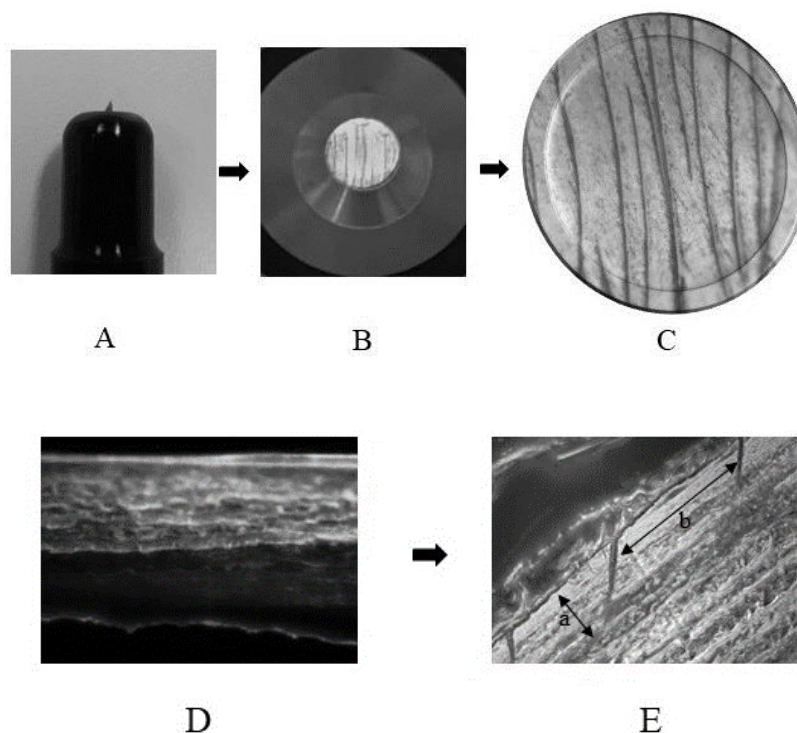
5.6 ESTUDOS DE CINÉTICA DE LIBERAÇÃO *IN VITRO*, PERMEAÇÃO *EX VIVO* E RETENÇÃO UNGUEAL DO CLORIDRATO DE TERBINAFINA

5.6.1 Obtenção, preparo e avaliação microscópica das amostras de unha humana

A avaliação dos canais criados pelo novo aparelho foi feita por microscopia. A Figura 28A mostra o novo dispositivo utilizado, que possui lâmina ajustável que foi fixada em 0,60mm de comprimento (semelhante ao Hydra.needle®). As figuras 28B e 28C, foram retiradas do recorte de unha com canais na superfície dorsal dentro do adaptador de unha (PermeGear Inc. Bethelhem, PA, EUA, área de difusão = 0,196 cm²), onde foi possível visualizar macroscopicamente os canais nas unhas utilizadas para os estudos de permeação. As fotomicrografias tiradas da porção lateral da unha após os tratamentos NP e MC são mostradas

nas figuras 28D e 28E, respectivamente (ampliação de 20x), demonstrando que os canais não ultrapassam a espessura da unha.

Figura 28 - Lâmina comercial com lâmina ajustável (A), Canais na face dorsal da unha evidenciados dentro do adaptador (B e C). Fotomicrografia da unha após lixamento e formação dos microcanais (D e E). (a) 64,28 μ m. (b) 149 μ m.



Fonte: a autora.

5.6.2 Estudo de Cinética de Liberação *in vitro* (IVRT)

No desenvolvimento de preparações ungueais antifúngicas, para selecionar as melhores formulações, alguns pesquisadores têm utilizado a técnica de difusão através de bolsa de diálise (avaliação do comportamento de liberação do fármaco a partir de diferentes formulações) (TANRIVERDI; ÖZER, 2013a; TUNCAY TANRIVERDI et al., 2016). Apesar de não ser um teste representativo do que ocorre *in vivo*, o estudo de liberação *in vitro* tem se mostrado útil na triagem de formulações.

A Figura 29 e as Tabelas 14 e 15 mostram a liberação comparativa de TB-HCl através de membranas hidrofóbicas (silicone e PTFE) entre as formulações de microemulsão, termogel e cristal líquido. A quantidade total de TB-HCl liberada através da membrana de silicone foi inferior a 3%, exceto para as formulações contendo acetato de etila, que apresentaram um

percentual liberado maior e estatisticamente significativo comparado com as demais. Um percentual liberado intermediário de TB-HCl, foi obtido a partir da formulação de cristal líquido.

Já ao utilizar a membrana de PTFE, o maior percentual de liberação foi obtido a partir das formulações de cristal líquido, seguido das microemulsionadas. Dentre as formulações de termogel, a presença de acetato de etila não provocou alteração significativa no percentual de liberação do TB-HCl. A liberação de TB-HCl foi maior e estatisticamente significativa para as formulações TG2% e TG4%. Esses resultados indicam, que a escolha da membrana é crítica em ensaios de liberação do fármaco, que são usados principalmente para fins de controle de qualidade.

Tabela 14 - Liberação cumulativa de TB-HCl (média $\pm$ DP; n = 6) expressa como porcentagem da dose aplicada através de membrana hidrofóbica (Silicone).

Tempo (h)	FORMULAÇÕES DE TERBINAFINA															
	Cumulativo (%)															
	TG TB (2%)		TG TB (4%)		TGKA TB (2%)		TGKA TB (4%)		CL TB (2%)		ME2 TB (2%)		ME2 TB (5%)		ME5 TB (7%)	
	Média	DP	Média	DP	Média	DP	Média	DP	Média	DP	Média	DP	Média	DP	Média	DP
0,08	0,16	0,02	0,19	0,04	2,10	0,98	1,93	0,64	1,55	0,17	0,03	0,00	0,02	0,00	0,02	0,00
0,16	0,32	0,01	0,59	0,16	7,11	1,98	5,47	1,34	2,94	0,49	0,09	0,03	0,04	0,00	0,04	0,01
0,33	0,49	0,03	1,36	0,48	17,57	5,56	11,69	2,00	5,10	1,12	0,16	0,02	0,08	0,01	0,06	0,01
0,50	0,61	0,04	1,79	0,66	29,22	5,81	18,20	3,84	6,48	1,41	0,21	0,02	0,10	0,01	0,09	0,02
0,75	0,66	0,03	2,20	0,82	38,49	7,40	27,08	5,47	8,62	2,79	0,28	0,02	0,14	0,02	0,11	0,02
1,0	0,71	0,01	2,40	0,89	44,88	8,35	32,97	7,51	10,12	2,75	0,35	0,04	0,15	0,01	0,13	0,01
2,0	0,77	0,05	2,49	0,94	63,63	12,2	50,16	13,7	13,10	3,47	0,43	0,06	0,21	0,02	0,19	0,01
						7		3								

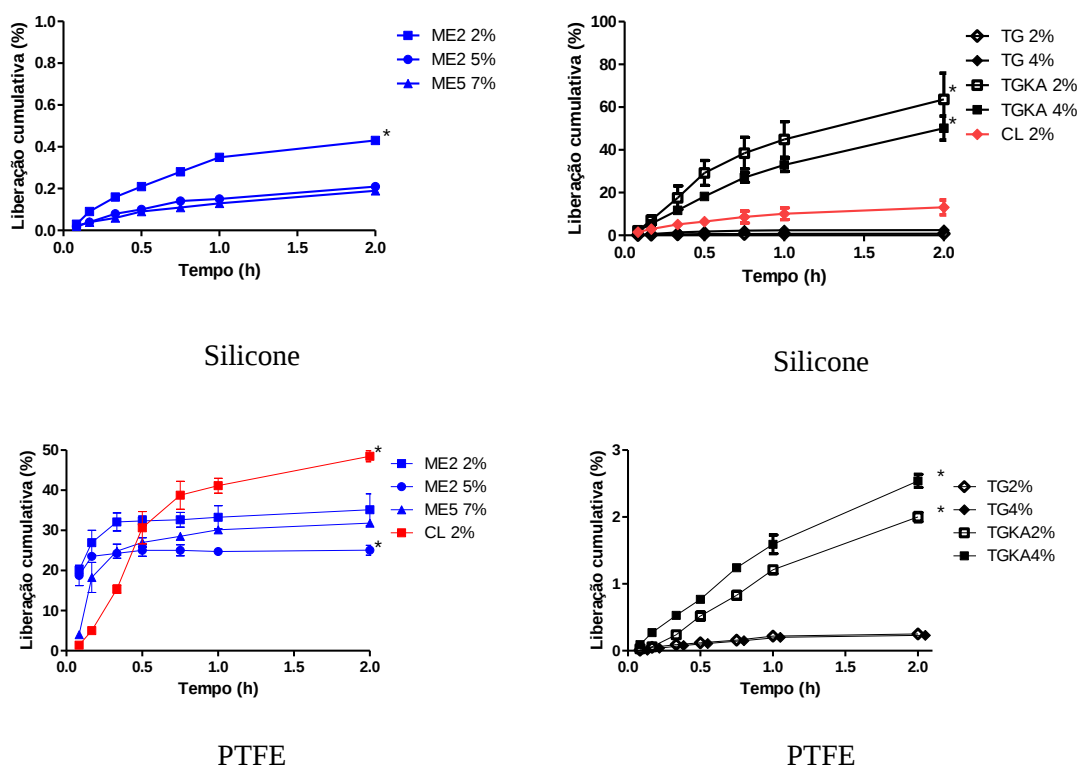
Fonte: a autora.

Tabela 15 - Liberação cumulativa de TB-HCl (média $\pm$ DP; n = 6) expressa como porcentagem da dose aplicada através de membrana hidrofóbica (PTFE).

Tempo (h)	FORMULAÇÕES DE TERBINAFINA															
	Cumulativo (%)															
	TG TB (2%)		TG TB (4%)		TGKA TB (2%)		TGKA TB (4%)		CL TB (2%)		ME2 TB (2%)		ME2 TB (5%)		ME5 TB (7%)	
	Média	DP	Média	DP	Média	DP	Média	DP	Média	DP	Média	DP	Média	DP	Média	DP
0,08	0,01	0,00	0,01	0,00	0,03	0,01	0,09	0,01	1,40	0,48	20,09	0,87	18,77	2,54	4,02	0,92
0,16	0,05	0,00	0,04	0,00	0,06	0,01	0,27	0,04	5,00	0,90	26,93	3,09	23,51	0,51	18,27	3,73
0,33	0,09	0,01	0,08	0,00	0,24	0,01	0,53	0,02	15,35	1,00	32,09	2,25	24,25	0,67	24,80	1,75
0,50	0,12	0,01	0,11	0,00	0,52	0,06	0,77	0,03	30,65	4,02	32,35	1,20	25,00	1,44	26,96	1,19
0,75	0,16	0,01	0,15	0,00	0,83	0,06	1,24	0,04	38,75	3,47	32,64	1,83	25,03	1,38	28,54	0,55
1,0	0,22	0,01	0,20	0,05	1,21	0,06	1,59	0,14	41,13	1,86	33,26	2,89	24,74	0,79	30,16	0,28
2,0	0,25	0,01	0,23	0,00	2,00	0,07	2,54	0,10	48,47	1,38	35,15	3,97	25,05	1,23	31,83	0,90

Fonte: a autora.

Figura 29 - Liberação cumulativa *in vitro* de TB-HCl (média $\pm$ DP, n=6) a partir de microemulsões (ME2 2%, ME2 5% e ME5 7%), termogeis (TG 2%, TG 4%, TGKA 2%, TGKA 4%) e cristal líquido (CL2%) através de membranas hidrofóbicas (Silicone e PTFE). Efeito significativo ($p < 0,05$) para a quantidade total liberada entre diferentes formulações (*) (ANOVA one-way, post-hoc Bonferroni). Os dados correspondentes ao TG 4% em membrana de PTFE foi ajustado em 0,05h para melhorar a visibilidade.



Fonte: a autora.

5.6.3 Estudo de permeação *in vitro* (IVPT) e retenção ungueal

Para realizar o primeiro teste (MD-NP), foram testadas três formulações de ME contendo 2, 5 e 7% de TB-HCl e uma formulação TG contendo 2% do fármaco. A Figura 31 e a Tabela 16 mostram a quantidade de TB-HCl retidas nas unhas.

Não foi observada diferença estatisticamente significativa nas retenções ungueais de TB-HCl entre as formulações utilizando o teste ANOVA two-way, post-hoc Bonferroni ($p < 0,05$). O fármaco não foi detectado na solução receptora (limite de quantificação do método 0,25 $\mu\text{g/mL}$) para nenhuma formulação.

Estudo descrito por Hui et al. (2013) mostra uma aplicação em regime multidose diário durante 14 dias, semelhante ao realizado neste trabalho, onde foi utilizada uma formulação de esmalte contendo, além de solventes orgânicos o hidróxido de sódio e ureia.

A avaliação foi realizada em células *in line* e doseado TB-HCl com carbono radiomarcado. Avaliações *ex vivo* com regime de aplicação multidose não são descritas com frequência na literatura.

Tabela 16 - TB-HCl retido na unha, após o primeiro teste (MD-NP). Dados individuais de cada experimento são mostrados. Dados expressos em massa de fármaco/massa de unha.

Primeiro teste (MD-NP)						
Formulação	TB-HCl-unha (µg/mg)				Média ± DP	CV (%)
ME2 2%	0,13	0,10	0,10	0,08	0,10 ± 0,02	20,11
ME2 5%	0,15	0,18	0,23	0,20	0,19 ± 0,03	17,72
ME5 7%	0,24	0,19	0,15	0,13	0,18 ± 0,05	27,36
TG 2%	0,15	0,17	0,20	0,22	0,19 ± 0,03	16,81

Fonte: a autora.

O segundo experimento (SD-MP), foi realizado para todas as formulações desenvolvidas com TB-HCl, aplicando uma dose única (50µL), após lixamento e realização de microporação com agulhas de titânio comercialmente disponíveis, no lado dorsal da unha.

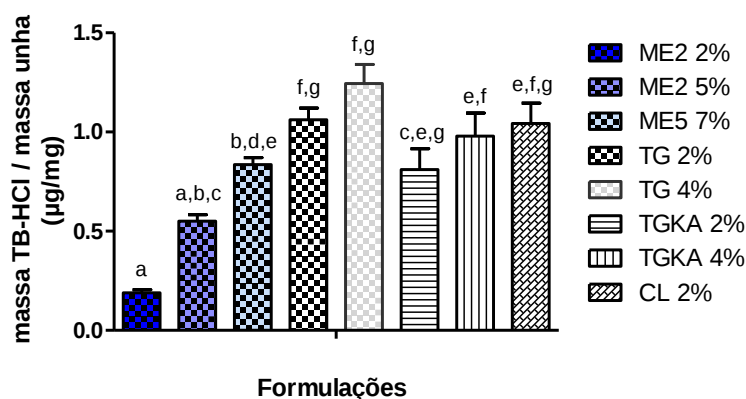
Nestes testes, as retenções ungueais de TB-HCl foram menores quando do uso da formulação ME2 2% e maiores quando do uso da TG 4% (Figura 31 e Tabela 17).

Tabela 17 - TB-HCl retido na unha, após segundo teste (SD-MP). Dados individuais de cada experimento são mostrados. Dados expressos em massa de fármaco/massa de unha.

Segundo teste (SD-MP)						
Formulação	TB-HCl -unha (µg/mg)				Média ± DP	CV (%)
ME2 2%	0,19	0,20	0,22	0,15	0,19 ± 0,03	15,53
ME2 5%	0,49	0,61	0,60	0,50	0,55 ± 0,07	12,13
ME5 7%	0,80	0,90	0,89	0,75	0,84 ± 0,07	8,66
TG 2%	1,05	1,07	0,92	1,21	1,06 ± 0,12	11,01
TG 4%	1,21	1,37	0,99	1,41	1,24 ± 0,19	15,42
TGKA 2%	0,59	1,09	0,77	0,80	0,81 ± 0,21	25,92
TGKA 4%	0,65	0,99	1,07	1,20	0,98 ± 0,23	23,83
CL 2%	1,02	0,98	0,83	1,32	1,04 ± 0,20	19,79

Fonte: a autora.

Figura 30 - Quantidade retida na unha de TB-HCl de todas as formulações ungueais no segundo experimento (SD-MP). Mesmas letras indicas grupos homogêneos (ANOVA one-way, post-hoc de Bonferroni, $\alpha < 0,05$).



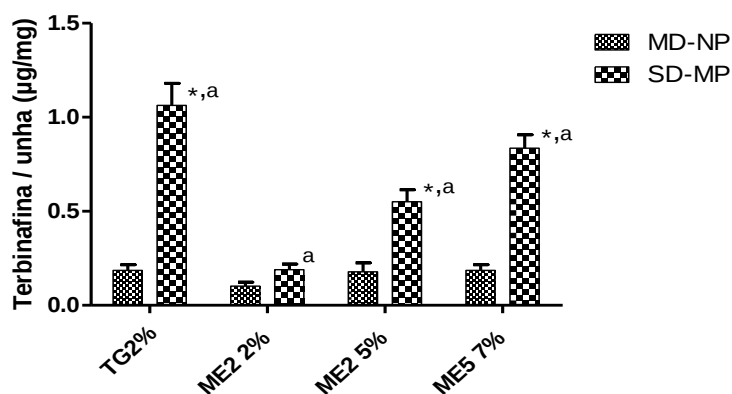
Fonte: a autora.

Após a microporação ungueal, foi possível observar uma maior e estatisticamente diferente retenção para a formulação TG4% comparado com todas as outras formulações exceto com a TG2% (ANOVA one way, post-hoc Bonferroni ($p < 0,05$), talvez devido à capacidade de adesão do polímero (Poloxamer®) nas camadas internas da lâmina ungueal (Figura 30).

Neste IVPT, mesmo com a presença de acetato de etila nas formulações de TGKA 2 e 4% não houve diminuição na quantidade de TB-HCl retido, comparado com as formulações TG2% e TG4%.

Ou seja, evaporação mais rápida do solvente, não provocou a diminuição da adesão do polímero na lâmina ungueal (Figura 30).

Figura 31 - Quantidade retida na unha de TB-HCl nas formulações ungueais do primeiro (MD-NP) x segundo experimento (SD-MP). Efeito significativo ($p < 0,001$) da poração (*); significativamente (0,001) diferente de todas as formulações foram diferentes entre si na condição SD-MP (a), após ANOVA two-way, post-hoc Bonferroni.



Fonte: a autora.

Comparando as retenções ungueais entre os tratamentos MD-NP e SD-MP (Figura 31) foi possível observar diferenças estatisticamente significativas entre as formulações apenas após o procedimento de poração, comparando com as mesmas formulações sem uso da poração.

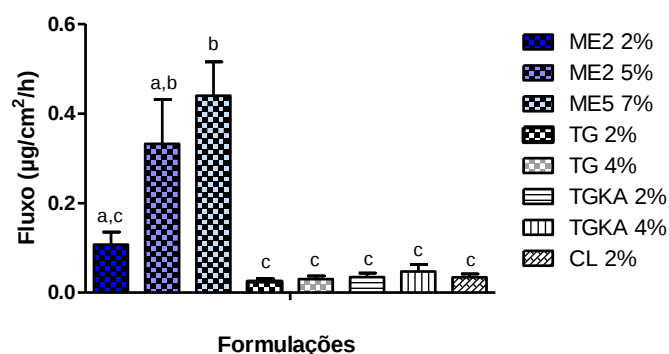
As quantidades de TB-HCl permeadas foram diferentes quando comparadas as diferentes formas farmacêuticas testadas, mostrando-se superiores para as microemulsões ME2 5% e ME5 7%. Isso demonstrou a capacidade desse sistema em potencializar o transporte do fármaco através da lâmina ungueal, após o auxílio do promotor físico de permeação (microporação).

O uso do Hydranneedle® em experimento semelhante, demonstrou um grande aumento na permeação ungueal, quando da aplicação de formulações contendo Ciclopírox olamina (dados do nosso grupo, não publicados).

A Figura 32 e a Tabela 18 mostram os fluxos de TB-HCl entre o intervalo de 7 e 14 dias do experimento. Os fluxos de TB-HCl não apresentaram diferenças estatisticamente significativas (ANOVA one way, post-hoc de Bonferroni ($p < 0,05$) entre todos os termogéis avaliados, independentemente de conterem diferentes concentrações de fármaco (2 ou 4%) e a ME2 2%.

Entre as microemulsões houve diferença estatisticamente significante entre ME2 2% e ME5 7%. Adicionalmente, o fluxo de TB-HCL foi cerca de 9 vezes maior entre a ME5 7% e a TGKA 4%.

Figura 32 - Fluxo entre 7 e 14 dias do segundo experimento (SD-MP). Mesmas letras indicas grupos homogêneos (ANOVA one-way, post-hoc de Bonferroni, $\alpha < 0,05$).



Fonte: a autora.

Tabela 18 - Fluxos de TB-HCl entre 7 e 14 dias de experimento, após o segundo teste (SD-MP). Dados individuais de cada experimento são mostrados.

Segundo teste (SD-MP)						
Formulação	Fluxo (µg/cm²/h)				Média ± DP	CV (%)
TG2%	0,03	0,03	0,03	0,01	0,02 ± 0,01	39,14
TG 4%	0,05	0,02	0,03	0,02	0,02 ± 0,01	46,07
TG KA 2%	0,02	0,05	0,02	0,05	0,04 ± 0,02	41,31
TG KA 4%	0,02	0,03	0,05	0,09	0,06 ± 0,03	50,68
ME 2%	0,13	0,09	0,17	0,04	0,10 ± 0,06	61,80
ME 5%	0,49	0,27	0,49	0,08	0,28 ± 0,21	73,28
ME 7%	0,63	0,30	0,34	0,49	0,38 ± 0,10	26,59
CL 2%	0,05	0,03	0,02	0,02	0,03 ± 0,01	47,14

Fonte: a autora.

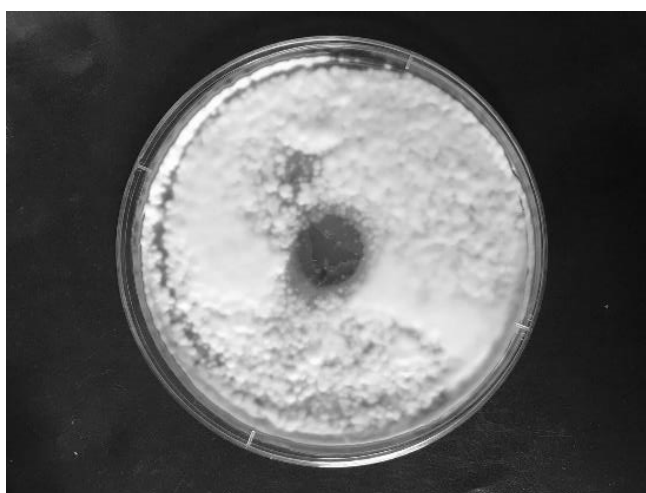
Para avaliar a permeação de terbinafina, Thatai; Sapra (2017) desenvolveram uma ME contendo 1% de TB-HCl, incluindo ureia e N-acetilcisteína como promotores de permeação. Esta formulação, preparada com Cremophor EL e Transcutol® P, apresentou melhor penetração (~5 vezes) e maior retenção (~9 vezes) em comparação com um creme comercial.

No entanto, o estudo de permeação foi realizado utilizando cascos bovinos. Considerando que o uso dos cascos bovinos como predição para a permeação ungueal humana é limitado, devido a maior permeabilidade dos cascos (CUTRÍN-GÓMEZ et al., 2018; TÄUBER; MÜLLER-GOYMANN, 2015), quaisquer comparações com os dados obtidos neste estudo aqui realizado não podem ser feitas.

Já Barot et al. (2012) desenvolveu também um sistema microemulsionado utilizando Labrasol® e Transcutol® P, contendo 4,4% de TB-HCl. No entanto, o estudo de permeação foi realizado utilizando pele e comparado ao creme comercial contendo TB-HCl a 1%.

A avaliação adicional do segundo teste de IVPT (SD-MP) demonstrou que apenas o LR obtido a partir de ME5 7%, foi capaz de inibir a atividade de *T. rubrum*. O percentual de inibição foi de $4,22 \pm 0,74$. A Figura 33 é representativa do teste.

Figura 33 - Ensaio microbiológico *in vitro*. Líquido receptor do segundo teste IVPT (SD-MP) a partir da ME5 7% após 14 dias.



Fonte: a autora.

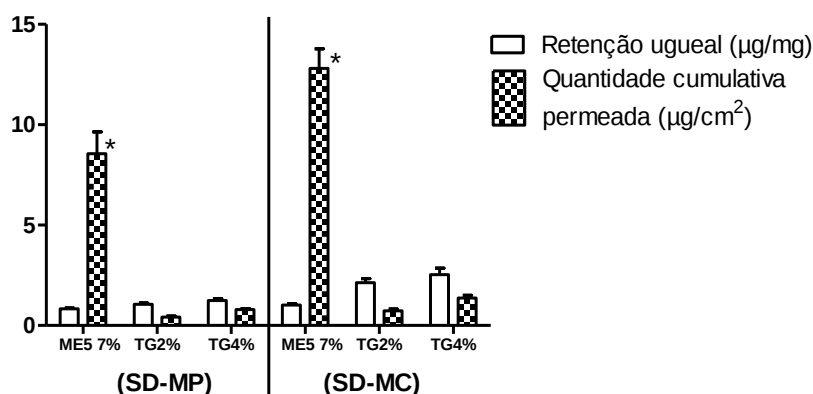
Para comparar o novo promotor físico de permeação (formação de microcanais), utilizado no terceiro experimento: SD-MC com o Hydra.needle® utilizado no segundo experimento: SD-MP, foram utilizando as formulações ME5 7% e TG 2 e 4%. A Figura 34 e a Tabela 19 mostram estes resultados.

A retenção do TB-HCl a partir da microemulsão foi a mesma independente do aparelho utilizado. No entanto, a retenção após a aplicação dos termogéis foi aproximadamente duas vezes maior, quando o novo método físico foi utilizado.

Ao mesmo tempo, a permeação do ME5 7% foi cerca de 10 vezes maior em comparação com o TG 4%, independente do tratamento utilizado, tornando esta formulação uma excelente escolha para os testes futuros.

Este é um resultado promissor, considerando que a onicomicose é a infecção fúngica da unha que pode envolver um ou mais componentes da unidade ungueal, incluindo a matriz ungueal, o leito ungueal e/ou a lâmina ungueal (THATAI; SAPRA, 2017).

Figura 34 - Quantidade retida nas unhas e a quantidade permeada cumulativa para o segundo (SD-NP) x terceiro experimento. (*) Quantidade cumulativa permeada significativamente diferente entre formulações e tratamentos (ANOVA two-way, post-hoc de Bonferroni, $\alpha < 0,05$).



Fonte: a autora.

Tabela 19 - Comparativo de TB-HCl retido na unha e quantidade cumulativa de TB-HCl permeado, seguindo o segundo (SD-MP) e o terceiro teste (SD-MC). Dados individuais de cada experimento são mostrados.

Tipo de teste	Formulação	Retenção na unha (µg/mg)				Média ± DP	Quantidade cumulativa permeada (µg/cm²)				Média ± DP
SD-MP	ME5 7%	0,80	0,90	0,89	0,75	0,84 ± 0,07	11,74	6,81	7,86	7,81	8,56 ± 2,18
	TG2%	1,05	1,07	0,92	1,21	1,06 ± 0,12	0,52	0,39	0,47	0,31	0,42 ± 0,09
	TG4%	1,21	1,37	0,99	1,41	1,25 ± 0,19	0,68	0,92	0,79	0,77	0,79 ± 0,10
SD-MC	ME5 7%	1,12	1,17	0,89	0,90	1,02 ± 0,15	15,27	10,89	13,36	11,71	12,81 ± 1,94
	TG2%	2,10	2,07	1,71	2,66	2,14 ± 0,39	0,94	0,66	0,80	0,50	0,73 ± 0,19
	TG4%	2,06	3,21	1,88	2,96	2,53 ± 0,66	1,15	1,76	1,41	1,15	1,37 ± 0,29

Fonte: a autora.

5.7 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIFÚNGICA TÓPICA A PARTIR DE MODELO IN VITRO

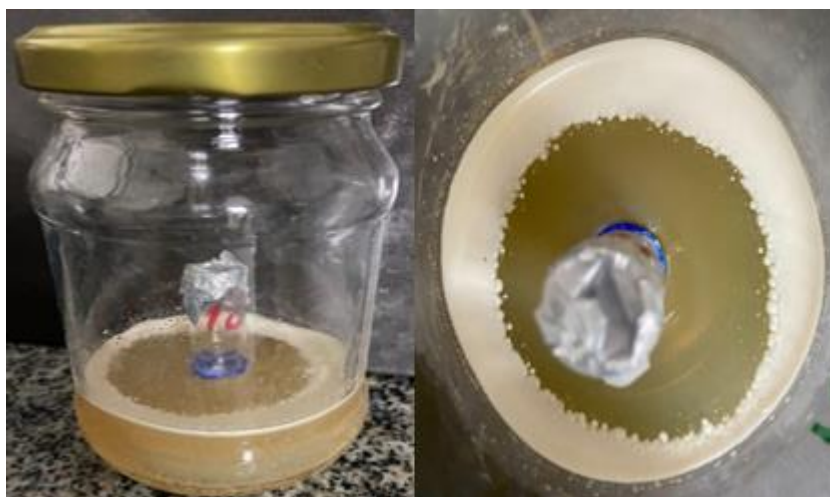
O teste microbiológico adaptado foi realizado com dois tipos de espécies de *Candida*: a *albicans* e a *parapsilosis*. Ambas as cepas ATCC foram expostas a formulações à base de Terbinafina (TG 2%, TG 4%, TGKa 2%, ME5 7%, ME5 7% E), e adicionalmente para o Ciclopirox (Micolamina®) e Amorolfina (Loceryl®) no caso da espécie de *C. albicans*. Os dois

últimos foram colocados como forma comparativa à Terbinafina, já que não existe um produto referência para TB-HCl.

Para os testes realizados com a *C. parapsilosis*, de todos os sistemas contendo formulações de TB-HCl, o maior halo ~60% foi evidenciado para a ME5 7% (viscosidade 43,2mPa a 25,8°C) apresentado na figura 35.

Este resultado corrobora com o acima mencionado para a inibição da *T. rubrum* (Figura 33), durante o teste de permeação *in vitro* SD-MP. Ao mesmo tempo, quando da inclusão do agente espessante (viscosidade 53,2mPa a 25,8°C), (ME5 7%E), não houve diferença significativa no tamanho do halo formado.

Figura 35 – Frasco com formulação ME5 7% na presença de *C. parapsilosis*: Halo visualizado lateralmente (à esquerda); Visão superior do halo (à direita)



Fonte: a autora.

Isto demonstra que esta formulação pode ser promissora para inibição de ambos os fungos testados. Ou seja, apesar do primeiro ser um FFND e o segundo um dermatófito, para ambos, houve resposta visual (halo).

Nesse estudo, em alguns casos, como a formulação TG4% (Figura 36), não houve a formação de halo. No entanto, também não foi observado nenhum crescimento de massa fúngica em mycosel, mesmo com aparecimento de estruturas no teste de exame direto.

Figura 36 - Frasco com formulação TG4% na presença de *C. parapsilosis*: Sistema visualizado lateralmente (à esquerda); Visão superior do frasco (à direita)



Fonte: a autora.

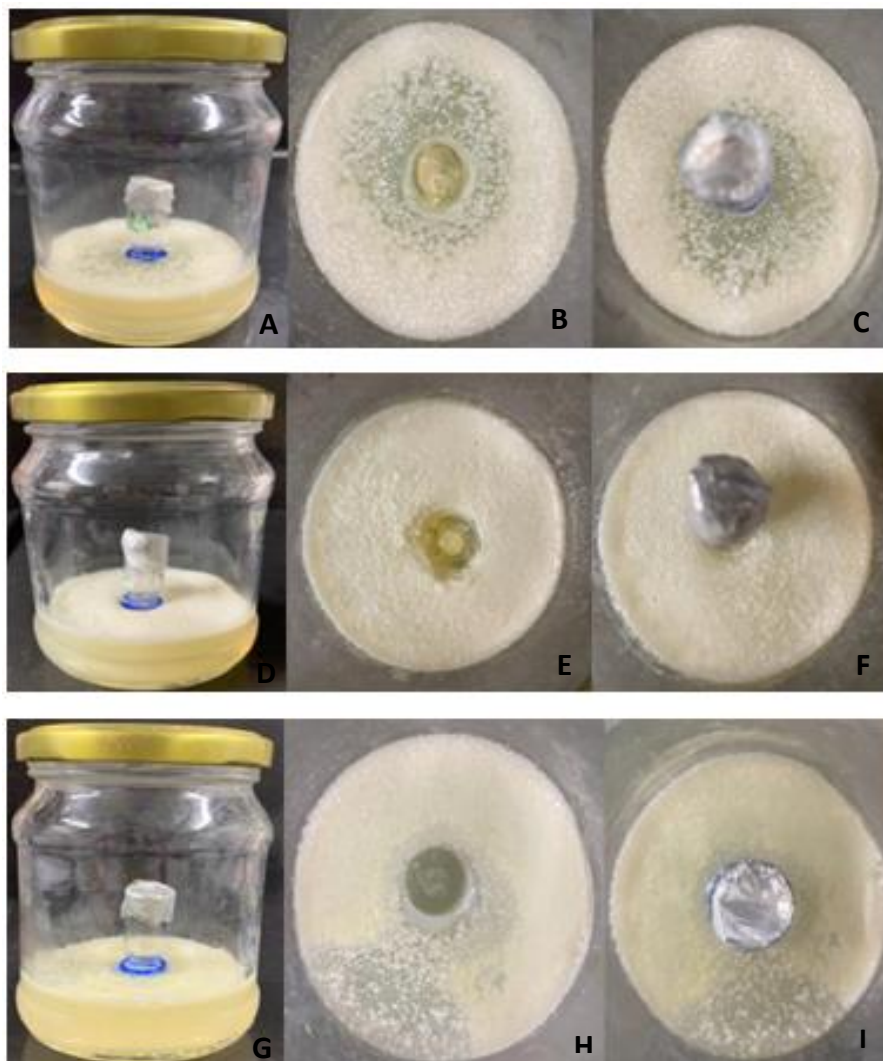
Isto sugere que, mesmo que o fungo tenha conseguido alcançar a unha, não haveria a instauração da patologia na unha, em virtude da ação da formulação.

Ao contrário do resultado observado a para *C. albicans*, para a *C. parapsilosis* não foram observados (Figura 37). Isso pode ser explicado pelo fato da terbinafina ser fungicida contra *parapsilosis*, mas fungistática contra a *albicans* (GUPTA; SAUDER; SHEAR, 1994; SEGAL et al., 1996)

De acordo com Gupta e colaboradores (2001), quando usada contra *Candida* sp, a terbinafina pode ser mais eficaz contra *C. parapsilosis* em comparação com infecções por *C. albicans*.

Trabalhos com o ensaio NCCLS (*National Committee for Clinical Laboratory Standards*) padronizado mostraram médias de CIMs de 1-2 µg/mL contra *Candida albicans* e de 0,08 µg/mL contra *C. parapsilosis*. (RYDER, N. S.; LEITNER, 1998).

Figura 37 – Frascos com formulação na presença de *C. albicans*



(A) Frasco com formulação Micolamina® (ciclopirox) visualizado superiormente sem (B) e com conjunto unha-frasco (C); (D) Frasco com formulação Loceryl® (Amorolfina) visualizado superiormente sem (E) e com conjunto unha-frasco (F); (G) Frasco com formulação ME5 7% (TB-HCl) visualizado superiormente sem (H) e com conjunto unha-frasco (I);

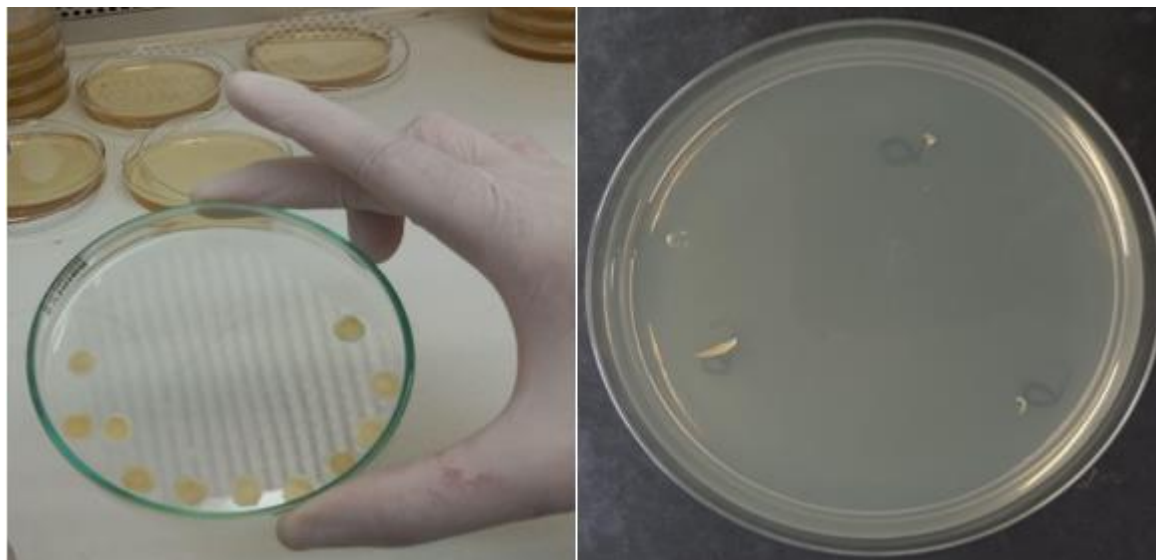
Fonte: a autora.

A atividade da TBF-HCl contra leveduras é muito variável, dependendo do sistema de teste usado. Ou seja, a temperatura, o tempo de incubação, o meio de cultura, o tamanho do inóculo, e a determinação do ponto de corte (estabelecidos pelas organizações de definição de padrões, o Comitê Europeu de Testes de Suscetibilidade Antimicrobiana (EUCAST) e o Instituto de Padrões Clínicos e Laboratoriais (CLSI), podem afetar muito os valores de CIM por isso a importância de seguir uma metodologia padronizada (ZALACAIN et al., 2011; ESPINEL-INGROFF; TURNIDGE, 2016)

Assim como para a terbinafina, os valores de CIM para a amorolfina e ciclopirox não foram determinados nestas cepas especificamente, mas baseados em testes realizados por pesquisadores utilizando ensaios padronizados do NCCLS. Para amorolfina a faixa do CIM encontrada, foi entre 0,05- 0,75 e 0,05- 2,00 para *C. albicans* e *C. parapsilosis*, respectivamente (HARMAN; ASHBEE; EVANS, 2004). Já para o Ciclopirox foi entre 0,06–0,5 e 0,13-0,5 para *C. albicans* e *C. parapsilosis*, respectivamente (SIU et al., 2013). Mesmo o CIM da terbinafina sendo relativamente maior contra a *C. albicans*, não houve variação significativa quanto aos sutis halos formados comparados ao cilopirox e amorolfina.

Somado a isto, o TB-HCl retido na unha, aparentemente, foi suficiente para inibir a atividade da *Candida* nesta membrana, já que não houve visualização de nenhuma estrutura fúngica no exame direto, nem crescimento de massa celular fúngica no meio de cultura (Figura 37).

Figura 37- Unhas após desmonte do conjunto unha-frasco (à esquerda); (B) Triplicata da mesma amostra de unha inoculada em meio (sem crescimento de massa celular) (à direita).



Fonte: a autora.

6 CONCLUSÃO

- A revisão sistemática foi fundamental para um melhor conhecimento sobre as formulações desenvolvidas contendo TB-HCl e os respectivos estudos de permeação;
- A avaliação da solubilidade e a busca de solubilizantes farmacêuticos otimizados para a TB-HCL, foi essencial para um desenvolvimento racional das formas farmacêuticas propostas;
- Foi possível desenvolver formulações microemulsionadas contendo até 7% do fármaco, com manutenção de suas características físico-químicas durante os 6 meses após fabricação (tempo total avaliado). Este sistema demonstrou a capacidade em potencializar o transporte do fármaco através da lâmina ungueal;
- Os termogéis desenvolvidos suportaram até 4% de TB-HCL e apresentam-se como uma possível formulação para aplicação ungueal em virtude do aumento da retenção ungueal;
- O estudo de liberação *in vitro*, mesmo utilizando membranas artificiais hidrofóbicas com características diferentes, ratifica que a escolha da membrana, por vezes, é crítica em ensaios de liberação do fármaco, que são usados principalmente para fins de controle de qualidade;
- Os resultados de IVPT sugerem que a combinação da microporação ungueal utilizando o Hydra.needle® e uma dose única das formulações, favoreceu a permeação do TB-HCL.
- O método físico de criação de microcanais testado parece ser uma opção viável no aumento da retenção e permeação do TB-HCL. No entanto, é necessária uma reavaliação deste dispositivo no intuito de melhor adequá-lo ao uso proposto neste trabalho.
- Os testes microbiológicos demonstraram um possível efeito de inibição do *T. rubrum*, *C. parapsilosis* de formulações de TB-HCL, e mais especificamente da formulação microemulsionada contendo 7% do ativo com e sem espessante;
- A formulação microemulsionada contendo 7% de TB-HCL (ME5 7%) parece ser a formulação de escolha para os testes futuros.

REFERÊNCIAS

- AGRAWAL, Vikas et al. Design and evaluation of microemulsion-based efinaconazole formulations for targeted treatment of onychomycosis through transungual route: Ex vivo and nail clipping studies. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 201, p. 111652, 2021.
- ALBARAHMIEH, E. et al. Fabrication of Dissolvable Microneedle Patches Using an Innovative Laser-Cut Mould Design to Shortlist Potentially Transungual Delivery Systems: In Vitro Evaluation. **AAPS PharmSciTech**, v. 20, n. 5, p. 215, 6 jul. 2019.
- ALBERTI, I. et al. In vivo assessment of enhanced topical delivery of terbinafine to human stratum corneum. **Journal of Controlled Release**, v. 71, n. 3, p. 319–327, abr. 2001.
- AMEEN, M. et al. British Association of Dermatologists' guidelines for the management of onychomycosis 2014. **British Journal of Dermatology**, v. 171, n. 5, p. 937–958, 19 nov. 2014.
- AMICHAÏ, B. et al. Iontophoretic Terbinafine HCL 1.0% Delivery Across Porcine and Human Nails. **Mycopathologia**, v. 169, n. 5, p. 343–349, 13 maio 2010.
- ANGAMUTHU, M. et al. Controlled-release injectable containing Terbinafine/PLGA microspheres for Onychomycosis Treatment. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 103, n. 4, p. 1178–1183, abr. 2014.
- ARRESE, J. E.; PIÉRARD, G. E. Treatment Failures and Relapses in Onychomycosis: A Stubborn Clinical Problem. **Dermatology**, v. 207, n. 3, p. 255–260, 2003.
- ATAIDES, F. S. et al. Antifungal susceptibility patterns of yeasts and filamentous fungi isolated from nail infection. **Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology**, p. no-no, nov. 2011.
- BADEN, H. P.; KUBILUS, J. Fibrous proteins of bovine hoof. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 81, n. 3, p. 220–224, 1983.
- BALFOUR, J. A.; FAULDS, D. Terbinafine. **Drugs**, v. 43, n. 2, p. 259–284, fev. 1992.
- BARAN, R.; KAOUKHOV, A. Topical antifungal drugs for the treatment of onychomycosis: an overview of current strategies for monotherapy and combination therapy. **Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology**, v. 19, n. 1, p. 21–29, jan. 2005.
- BARAN, R.; TOSTI, A. Chemical avulsion with urea nail lacquer. **Journal of Dermatological Treatment**, v. 13, n. 4, p. 161–164, 19 jan. 2002.
- BAROT, B. S. et al. Microemulsion-Based Gel of Terbinafine for the Treatment of Onychomycosis: Optimization of Formulation Using D-Optimal Design. **AAPS PharmSciTech**, v. 13, n. 1, p. 184–192, 22 mar. 2012.

BAROT, Bhavesh S. et al. Microemulsion-based antifungal gel delivery to nail for the treatment of onychomycosis: formulation, optimization, and efficacy studies. **Drug delivery and translational research**, v. 2, n. 6, p. 463-476, 2012.

BECHTOLD, Ivan Helmuth. Liquid crystals: a complex system of simple application. **Revista Brasileira de Ensino de Física**, v. 27, p. 333-342, 2005.

BOHN, M.; KRAEMER, K. T. Dermatopharmacology of ciclopirox nail lacquer topical solution 8% in the treatment of onychomycosis. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 43, n. 4 SUPPL., p. S57-S69, 1 out. 2000.

BOKER, A. et al. A double-blind, placebo-controlled, pilot study of 1% terbinafine cream delivered A double-blind, placebo-controlled, pilot study of 1% terbinafine cream delivered via toenail microconduits for the treatment of subungual onychomycosis via toenail microconduits for the treatment of subungual onychomycosis. 2007.

BOWMAN, S. M.; FREE, S. J. The structure and synthesis of the fungal cell wall. **BioEssays**, v. 28, n. 8, p. 799-808, ago. 2006.

BRASIL. Microbiologia Clínica para o Controle de Infecção Relacionada à Assistência à Saúde. Módulo 8: Detecção e identificação de fungos de importância médica. 2013.

BRILLOWSKA-DĄBROWSKA, A.; SAUNTE, D. M.; ARENDRUP, M. C. Five-Hour Diagnosis of Dermatophyte Nail Infections with Specific Detection of *Trichophyton rubrum*. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 45, n. 4, p. 1200-1204, abr. 2007.

BROWN, M. B. et al. Overcoming the nail barrier: A systematic investigation of ungual chemical penetration enhancement. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 370, n. 1-2, p. 61-67, 31 mar. 2009.

BUENO, J. G. et al. In vitro activity of fluconazole, itraconazole, voriconazole and terbinafine against fungi causing onychomycosis. **Clinical and Experimental Dermatology**, v. 35, n. 6, p. 658-663, 23 out. 2009.

CABANA, Alain; AÏT-KADI, Abdellatif; JUHÁSZ, Julianna. Study of the gelation process of polyethylene oxide-polypropylene oxide-polyethylene oxide copolymer (poloxamer 407) aqueous solutions. *Journal of colloid and interface science*, v. 190, n. 2, p. 307-312, 1997.

CAROLIS, Elena De et al. Identification and typing of the *Candida parapsilosis* complex: MALDI-TOF MS vs. AFLP. **Sabouraudia**, v. 52, n. 2, p. 123-130, 2014.

CAVALLERA, E.; ASBATI, M. Onicomicosis por hongos filamentosos no dermatofitos. **Dermatología Venezolana**, v. 44, p. 4-10, 2006.

CHI, C. C.; WANG, S. H.; CHOU, M. C. The causative pathogens of onychomycosis in southern Taiwan. **Mycoses**, v. 48, n. 6, p. 413-420, nov. 2005.

CHIU, W. S. et al. Drug delivery into microneedle-porated nails from nanoparticle reservoirs. **Journal of Controlled Release**, v. 220, p. 98–106, dez. 2015.

CHOUHAN, P.; SAINI, T. R. Hydration of nail plate: A novel screening model for transungual drug permeation enhancers. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 436, n. 1–2, p. 179–182, 15 out. 2012.

CHOUHAN, P.; SAINI, T. R. Hydroxypropyl- β -cyclodextrin: A Novel Transungual Permeation Enhancer for Development of Topical Drug Delivery System for Onychomycosis. **Journal of Drug Delivery**, v. 2014, p. 1–7, 6 ago. 2014.

CIOCON, D. et al. How Low Should You Go: Novel Device for Nail Trephination. **Dermatologic Surgery**, v. 32, n. 6, p. 828–833, 7 jun. 2006.

CLISSOLD, S. P.; HEEL, R. C. Tioconazole. **Drugs**, v. 31, n. 1, p. 29–51, jan. 1986.

CLSI. Método de referência para testes de diluição em caldo para determinação de sensibilidade de leveduras à terapia antifúngica. Documento NCCLS M27-A2. Norma Aprovada .2ªed. 2002.

CLSI. Método de referência para testes de diluição em caldo para determinação de sensibilidade fungos filamentosos à terapia antifúngica. Documento NCCLS M28-A2. Norma Aprovada .2ªed. 2008.

CRAWFORD, F.; HOLLIS, S. Topical treatments for fungal infections of the skin and nails of the foot. **Cochrane Database of Systematic Reviews**, v. 2007, n. 3, 2007.

CUTRÍN-GÓMEZ, E. et al. Effect of penetration enhancers on drug nail permeability from cyclodextrin/poloxamer-soluble polypseudorotaxane-based nail lacquers. **Pharmaceutics**, v. 10, n. 4, 1 dez. 2018.

DANIEL, C. R.; NORTON, L. A.; SCHER, R. K. The spectrum of nail disease in patients with human immunodeficiency virus infection. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 27, n. 1, p. 93–97, jul. 1992.

DANIEL, C. R. et al. Candida infection of the nail: role of Candida as a primary or secondary pathogen. **International journal of dermatology**, v. 37, p. 904-907, 1998.

DANIEL, R. C. Onychomycosis: burden of disease and the role of topical antifungal treatment. **Journal of drugs in dermatology : JDD**, v. 12, n. 11, p. 1263–6, nov. 2013.

DE ARAÚJO, A. J. G. et al. Onicomicoses por fungos emergentes: análise clínica, diagnóstico laboratorial e revisão. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 78, n. 4, p. 445–455, 2003.

DE BEDOUT, Catalina; GÓMEZ, Beatriz L. Candida y candidiasis invasora: un reto continuo para su diagnóstico temprano. **Infectio**, v. 14, p. 159-171, 2010.

DE BERKER, D. Fungal Nail Disease. **New England Journal of Medicine**, v. 360, n. 20, p. 2108–2116, 14 maio 2009.

DE BERKER, D. **Nail anatomy** *Clinics in Dermatology*, set. 2013.

DE DONCKER, P. Antifungal pulse therapy for onychomycosis. A pharmacokinetic and pharmacodynamic investigation of monthly cycles of 1-week pulse therapy with itraconazole. **Archives of Dermatology**, v. 132, n. 1, p. 34–41, 1 jan. 1996.

DE LIMA, Ellison Neves et al. Levobupivacaine thermogel for long-acting analgesia. *AAPS PharmSciTech*, v. 19, p. 2533-2542, 2018.

DE MAGALHÃES LIMA, K. et al. Hongos filamentosos no dermatofitos: onicomycosis en cuatro pacientes infectados con el virus de la inmunodeficiencia humana. **Revista Iberoamericana de Micología**, v. 25, n. 1, p. 45–49, mar. 2008.

DEBRUYNE, D.; COQUEREL, A. Pharmacokinetics of Antifungal Agents in Onychomycoses. **Clinical Pharmacokinetics**, v. 40, n. 6, p. 441–472, 2001.

DELGADO-CHARRO, M. B. Iontophoretic drug delivery across the nail. **Expert Opinion on Drug Delivery**, v. 9, n. 1, p. 91–103, 7 jan. 2012.

DI CHIACCHIO, N. et al. Nail abrasion. **Journal of Cosmetic Dermatology**, v. 2, n. 3–4, p. 150–152, jul. 2003.

DÍAZ, D. C. et al. Transungual delivery of ciclopirox is increased 3–4-fold by mechanical fenestration of human nail plate in an in vitro model. **Pharmaceutics**, v. 11, n. 1, 1 jan. 2019.

DOS SANTOS, J. I.; COELHO, M. P. P.; NAPPI, B. P. Diagnóstico laboratorial das dermatofitoses Dermatophytosis' laboratorial diagnosis. **3 RBAC**, v. 34, n. 1, p. 3–6, 2002.

DUMORTIER, Gilles et al. A review of poloxamer 407 pharmaceutical and pharmacological characteristics. *Pharmaceutical research*, v. 23, p. 2709-2728, 2006.

EFFENDY, I. et al. Epidemiology and clinical classification of onychomycosis. **Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology**, v. 19, n. s1, p. 8–12, set. 2005.

ELEWSKI, B. E. Mechanisms of action of systemic antifungal agents. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 28, n. 5, p. S28–S34, maio 1993.

ELEWSKI, Boni E. Onychomycosis: pathogenesis, diagnosis, and management. **Clinical microbiology reviews**, v. 11, n. 3, p. 415-429, 1998.

ELEWSKI, B. E.; TOSTI, A. Tavaborole for the treatment of onychomycosis. **Expert opinion on pharmacotherapy**, v. 15, n. 10, p. 1439–1448, 2014.

ELKEEB, R. et al. Transungual drug delivery: Current status. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 384, n. 1–2, p. 1–8, 15 jan. 2010.

ELSAYED, M. M. A. Development of topical therapeutics for management of onychomycosis and other nail disorders: A pharmaceutical perspective. **Journal of Controlled Release**, v. 199, p. 132–144, fev. 2015.

ELSHERIF, N. I.; SHAMMA, R. N.; ABDELBAR, G. Terbinafine Hydrochloride Trans-ungual Delivery via Nanovesicular Systems: In Vitro Characterization and Ex Vivo Evaluation. **AAPS PharmSciTech**, v. 18, n. 2, p. 551–562, 2 fev. 2017.

ESPINEL-INGROFF, Ana; TURNIDGE, John. The role of epidemiological cutoff values (ECVs/ECOFFs) in antifungal susceptibility testing and interpretation for uncommon yeasts and moulds. **Revista Iberoamericana de Micología**, v. 33, n. 2, p. 63-75, 2016.

FAERGEMANN, J.; BARAN, R. Epidemiology, clinical presentation and diagnosis of onychomycosis. **British Journal of Dermatology, Supplement**, v. 149, n. 65, p. 1–4, 2003.

FLORES, F. C. et al. Enhancement of tioconazole ungual delivery: Combining nanocapsule formulation and nail poration approaches. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 535, n. 1–2, p. 237–244, 15 jan. 2018.

FRANZ, T. J. Percutaneous Absorption. On the Relevance of in Vitro Data. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 64, n. 3, p. 190–195, mar. 1975.

FRANZ, T. J. The Finite Dose Technique as a Valid in vitro Model for the Study of Percutaneous Absorption in Man. In: [s.l.: s.n.]. p. 58–68.

GAN, Li et al. Self-assembled liquid crystalline nanoparticles as a novel ophthalmic delivery system for dexamethasone: improving preocular retention and ocular bioavailability. **International journal of pharmaceutics**, v. 396, n. 1-2, p. 179-187, 2010.

GHANNOUM, M.; ISHAM, N. Fungal Nail Infections (Onychomycosis): A Never-Ending Story? **PLoS Pathogens**, v. 10, n. 6, 2014.

GIANNI; CERRI; CROSTI. Non-dermatophytic onychomycosis. An underestimated entity? A study of 51 cases. **Mycoses**, v. 43, n. 1–2, p. 29–33, mar. 2000.

GREGORÍ VALDES, B. S. et al. New Polyurethane Nail Lacquers for the Delivery of Terbinafine: Formulation and Antifungal Activity Evaluation. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 106, n. 6, p. 1570–1577, jun. 2017.

GREGORIOU, S. et al. Nail disorders and systemic disease: what the nails tell us. **The Journal of family practice**, v. 57, n. 8, p. 509–14, ago. 2008.

GÓMEZ-MOLERO, Emilia et al. Candida parapsilosis colony morphotype forecasts biofilm formation of clinical isolates. **Journal of Fungi**, v. 7, n. 1, p. 33, 2021.

GUNT, H. B.; KASTING, G. B. Effect of hydration on the permeation of ketoconazole through human nail plate in vitro. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 32, n. 4–5, p. 254–260, dez. 2007.

GUO, Chenyu et al. Lyotropic liquid crystal systems in drug delivery. **Drug discovery today**, v. 15, n. 23-24, p. 1032-1040, 2010.

GUPTA, Aditya K.; SAUDER, Daniel N.; SHEAR, Neil H. Antifungal agents: an overview. Part II. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 30, n. 6, p. 911-933, 1994.

GUPTA, A. K. et al. An Overview of Topical Antifungal Therapy in Dermatomycoses. **Drugs**, v. 55, n. 5, p. 645–674, 1998.

GUPTA, A. K. et al. Epidemiology and prevalence of onychomycosis in HIV-positive individuals. **International Journal of Dermatology**, v. 39, n. 10, p. 746–753, out. 2000.

GUPTA, Aditya K. et al. The use of the new oral antifungal agents, itraconazole, terbinafine, and fluconazole to treat onychomycosis and other dermatomycoses. **Current Problems in Dermatology**, v. 13, n. 4, p. 213-246, 2001.

GUPTA, A. K. et al. Non-dermatophyte onychomycosis. **Dermatologic Clinics**, v. 21, n. 2, p. 257–268, abr. 2003.

GUPTA, A. K.; MAYS, R. R. The Impact of Onychomycosis on Quality of Life: A Systematic Review of the Available Literature. **Skin appendage disorders**, v. 4, n. 4, p. 208–216, 1 out. 2018.

GUPTA, A. K.; PAQUET, M.; SIMPSON, F. C. Therapies for the treatment of onychomycosis. **Clinics in Dermatology**, v. 31, n. 5, p. 544–554, set. 2013.

GUPTA, A. K.; SHEAR, N. H. Safety review of the oral antifungal agents used to treat superficial mycoses. **International Journal of Dermatology**, v. 38, p. 40–52, 1999.

GUPTA, A. K.; SHEAR, N. H.; TORONTO, F. Terbinafine: An update. 1997.

GUPTA, A. K.; SIMPSON, F. C. New therapeutic options for onychomycosis. **Expert Opinion on Pharmacotherapy**, v. 13, n. 8, p. 1131–1142, 25 jun. 2012.

GUPTA, A. K.; SIMPSON, F. C. New pharmacotherapy for the treatment of onychomycosis: An update. **Expert Opinion on Pharmacotherapy**, v. 16, n. 2, p. 227–236, 1 fev. 2015.

GUPTA, A. K.; STUDHOLME, C. Novel investigational therapies for onychomycosis: An update. **Expert Opinion on Investigational Drugs**, v. 25, n. 3, p. 297–305, 3 mar. 2016a.

GUPTA, A. K.; STUDHOLME, C. How do we measure efficacy of therapy in onychomycosis: Patient, physician, and regulatory perspectives. **Journal of Dermatological Treatment**, v. 27, n. 6, p. 498–504, 4 nov. 2016b.

GUPTA, A. K.; VERSTEEG, S. G. Tavaborole – a treatment for onychomycosis of the toenails. **Expert Review of Clinical Pharmacology**, v. 9, n. 9, p. 1145–1152, 1 set. 2016.

- GUPTA, A. K.; VERSTEEG, S. G.; SHEAR, N. H. Onychomycosis in the 21st century: An update on diagnosis, epidemiology, and treatment. **Journal of Cutaneous Medicine and Surgery**, v. 21, n. 6, p. 525–539, 1 jun. 2017a.
- HAGHANI, I. et al. Comparison of Diagnostic Methods in the Evaluation of Onychomycosis. **Mycopathologia**, v. 175, n. 3–4, p. 315–321, 1 abr. 2013.
- HANEKE, E. Surgical Anatomy of the Nail Apparatus. **Dermatologic Clinics**, v. 24, n. 3, p. 291–296, jul. 2006.
- HANEKE, E. et al. Anatomie, biologie, physiologie und grundzüge der pathologie des nagelorgans. **Hautarzt**, v. 65, p. 282–290, 2014.
- HAO, J.; SMITH, K. A.; LI, S. K. Chemical method to enhance transungual transport and iontophoresis efficiency. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 357, n. 1–2, p. 61–69, 5 jun. 2008.
- HARMAN, S.; ASHBEE, H. R.; EVANS, E. G. V. Testing of antifungal combinations against yeasts and dermatophytes. *Journal of dermatological treatment*, v. 15, n. 2, p. 104–107, 2004.
- HAVU, V. et al. A double-blind, randomized study comparing itraconazole pulse therapy with continuous dosing for the treatment of toe-nail onychomycosis. **The British journal of dermatology**, v. 136, n. 2, p. 230–4, fev. 1997.
- HAY, Roderick J. The management of superficial candidiasis. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 40, n. 6, p. S35–S42, 1999.
- HAY, Roderick. Superficial fungal infections. **Medicine**, v. 41, n. 12, p. 716–718, 2013.
- HAY, R. J. et al. Fungal (Onychomycosis) and Other Infections Involving the Nail Apparatus. In: **Baran & Dawber's Diseases of the Nails and their Management**. Chichester, UK: John Wiley & Sons, Ltd, p. 349–389, 2018.
- HAY, R. J.; BARAN, R. Onychomycosis: A proposed revision of the clinical classification. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 65, n. 6, p. 1219–1227, 1 dez. 2011.
- HEUSCHKEL, Sandra; GOEBEL, Alexandra; NEUBERT, Reinhard HH. Microemulsions—modern colloidal carrier for dermal and transdermal drug delivery. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 97, n. 2, p. 603–631, 2008.
- HO, Mae-Wan et al. Organisms as polyphasic liquid crystals. **Bioelectrochemistry and Bioenergetics**, v. 41, n. 1, p. 81–91, 1996.
- HUI, Xiaoying et al. Enhanced human nail drug delivery: nail inner drug content assayed by new unique method. **Journal of pharmaceutical sciences**, v. 91, n. 1, p. 189–195, 2002.

HUI, X. et al. Onychopharmacokinetics of terbinafine hydrochloride penetration from a novel topical formulation into the human nail in vitro. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, v. 39, n. 9, p. 1401–1407, 9 set. 2013.

IOANNIDOU, D. et al. The epidemiology of onychomycoses in Crete, Greece, between 1992 and 2001. **Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology**, v. 20, n. 2, p. 170–174, fev. 2006.

IORIZZO, M.; PIRACCINI, B. M.; TOSTI, A. Today's treatments options for onychomycosis. **Journal der Deutschen Dermatologischen Gesellschaft = Journal of the German Society of Dermatology : JDDG**, v. 8, n. 11, p. 875–879, nov. 2010.

JAIN, S.; SEHGAL, V. N. Onychomycosis: an epidemio-etilogic perspective. **International Journal of Dermatology**, v. 39, n. 2, p. 100–103, fev. 2000.

JAMES, M. P.; GRAHAM, R. M.; ENGLISH, J. Percutaneous iontophoresis of prednisolone—a pharmacokinetic study. **Clinical and Experimental Dermatology**, v. 11, n. 1, p. 54–61, jan. 1986.

JAYATILAKE, J. A. M. S.; TILAKARATNE, W. M.; PANAGODA, G. J. Candidal onychomycosis: a mini-review. **Mycopathologia**, v. 168, n. 4, p. 165–173, set. 2009.

JOHNSON, M. D. et al. Combination Antifungal Therapy. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 48, n. 3, p. 693–715, 1 mar. 2004.

JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. **Histologia básica**. 10^o ed. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004.

KASHYAP, B.; BHALLA, P.; KAUR, R. Onychomycosis - epidemiology, diagnosis and management. **Indian Journal of Medical Microbiology**, v. 26, n. 2, p. 108, 2008.

KASSAN, D. G.; LYNCH, A. M.; STILLER, M. J. Physical enhancement of dermatologic drug delivery: Iontophoresis and phonophoresis. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 34, n. 4, p. 657–666, abr. 1996.

KERAI, L. V. et al. Two strategies to enhance ungual drug permeation from UV-cured films: Incomplete polymerisation to increase drug release and incorporation of chemical enhancers. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 123, p. 217–227, out. 2018.

KERAI, L. V.; HILTON, S.; MURDAN, S. UV-curable gel formulations: Potential drug carriers for the topical treatment of nail diseases. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 492, n. 1–2, p. 177–190, ago. 2015.

KHENGAR, R. H. et al. Nail swelling as a pre-formulation screen for the selection and optimisation of ungual penetration enhancers. **Pharmaceutical Research**, v. 24, n. 12, p. 2207–2212, 31 dez. 2007.

KIM, Seong-Kyoun; BISSATI, Kamal El; MAMOUN, Choukri Ben. Amino acids mediate colony and cell differentiation in the fungal pathogen *Candida parapsilosis*. **Microbiology**, v. 152, n. 10, p. 2885-2894, 2006.

KOBAYASHI, Y. et al. Enhancing effect of N-acetyl-L-cysteine or 2-mercaptoethanol on the in vitro permeation of 5-fluorouracil or tolnaftate through the human nail plate. **Chemical and Pharmaceutical Bulletin**, v. 46, n. 11, p. 1797–1802, 1998.

KONEMAN, E. et al. **Diagnóstico microbiológico**. 6ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008.

KRACHT, Tobias; MÜLLER-GOYMANN, Christel C. Antifungal efficacy of liquid poloxamer 407-based emulsions loaded with sertaconazole nitrate. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 585, p. 119400, 2020.

KUMAR, K. JAYA RAJA; MURALIDHARAN, Selvadurai; DHANARAJ, Sokkalingam Arumugam. Anti-fungal activity of microemulsion based fluconazole gel for onychomycosis against *Aspergillus Niger*. **International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**, v. 5, n. 1, p. 96-102, 2012

KUSHWAHA, A.; SHIVAKUMAR, H. N.; MURTHY, S. N. Iontophoresis for drug delivery into the nail apparatus: exploring hyponychium as the site of delivery. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, v. 42, n. 10, p. 1678–1682, 2 out. 2016.

LACAZ, C. DA SILVA. et al. *Tratado de micologia médica* Lacaz. 2002.

LAWRENCE, M. Jayne; REES, Gareth D. Microemulsion-based media as novel drug delivery systems. **Advanced drug delivery reviews**, v. 45, n. 1, p. 89-121, 2000.

LECHA, M. et al. Treatment options - Development of consensus guidelines. **Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology**, v. 19, n. SUPPL. 1, p. 25–33, set. 2005.

LIPNER, Shari R.; SCHER, Richard K. Onychomycosis: Treatment and prevention of recurrence. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 80, n. 4, p. 853-867, 2019.

LIU, Tianbo; CHU, Benjamin. Formation of homogeneous gel-like phases by mixed triblock copolymer micelles in aqueous solution: FCC to BCC phase transition. *Journal of applied crystallography*, v. 33, n. 3, p. 727-730, 2000.

LUPETTI, Antonella et al. Horizontal transmission of *Candida parapsilosis* candidemia in a neonatal intensive care unit. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 40, n. 7, p. 2363-2369, 2002.

MAHONEY, J. M.; BENNET, J.; OLSEN, B. The diagnosis of onychomycosis. **Dermatologic Clinics**, v. 21, n. 3, p. 463–467, jul. 2003.

- MALHOTRA, G. G.; ZATZ, J. L. Investigation of nail permeation enhancement by chemical modification using water as a probe. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 91, n. 2, p. 312–323, 2002.
- MARKINSON, B.; MONTER, S.; CABRERA, G. Traditional approaches to treatment of onychomycosis. **Journal of the American Podiatric Medical Association**, v. 87, n. 12, p. 551–556, 1 dez. 1997.
- MCCLEMENTS, David Julian. Nanoemulsions versus microemulsions: terminology, differences, and similarities. *Soft matter*, v. 8, n. 6, p. 1719–1729, 2012.
- MERTIN, D.; LIPPOLD, B. C. In-vitro permeability of the human nail and of a keratin membrane from bovine hooves: Prediction of the penetration rate of antimycotics through the nail plate and their efficacy. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 49, n. 9, p. 866–872, 1997.
- MITRAGOTRI, S.; KOST, J. Low-frequency sonophoresis. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 56, n. 5, p. 589–601, mar. 2004.
- MOHORČIČ, M. et al. An investigation into keratinolytic enzymes to enhance ungual drug delivery. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 332, n. 1–2, p. 196–201, mar. 2007.
- MONTENEGRO, Lucia et al. From nanoemulsions to nanostructured lipid carriers: A relevant development in dermal delivery of drugs and cosmetics. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, v. 32, p. 100–112, 2016.
- MONTI, D. et al. Validation of bovine hoof slices as a model for infected human toenails: In vitro ciclopirox transungual permeation. **British Journal of Dermatology**, v. 165, n. 1, p. 99–105, jul. 2011.
- MORRIS-JONES, Rachael et al. Synthesis of melanin pigment by *Candida albicans* in vitro and during infection. **Infection and immunity**, v. 73, n. 9, p. 6147–6150, 2005.
- MÜGGE, Claudia; HAUSTEIN, Uwe-Frithjof; NENOFF, Pietro. Causative agents of onychomycosis—a retrospective study. **JDDG: Journal der Deutschen Dermatologischen Gesellschaft**, v. 4, n. 3, p. 218–228, 2006.
- MUJICA, M. T. et al. Prevalencia de *Candida albicans* y *Candida no albicans* en diferentes muestras clínicas: Período 1999–2001. **Revista argentina de microbiología**, v. 36, n. 3, p. 107–112, 2004.
- MÜLLER-GOYMANN, C. C. Physicochemical characterization of colloidal drug delivery systems such as reverse micelles, vesicles, liquid crystals and nanoparticles for topical administration. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 58, n. 2, p. 343–356, 2004.
- MURDAN, S. Drug delivery to the nail following topical application. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 236, n. 1–2, p. 1–26, 2 abr. 2002.

MURDAN, S. Enhancing the nail permeability of topically applied drugs. **Expert Opinion on Drug Delivery**, v. 5, n. 11, p. 1267–1282, nov. 2008.

MURTHY, S. N.; MAIBACH, H. I. **Topical Nail Products and Ungual Drug Delivery**. 1st Edition ed. [s.l: s.n.].

MURTHY, S. N.; WISKIRCHEN, D. E.; BOWERS, C. P. Iontophoretic drug delivery across human nail. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 96, n. 2, p. 305–311, 2007.

NAIR, A. B.; KIRAN VAKA, S. R.; MURTHY, S. N. Transungual delivery of terbinafine by iontophoresis in onychomycotic nails. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, v. 37, n. 10, p. 1253–1258, 4 out. 2011.

NEEV, J. et al. **Ablation of Human Nail by Pulsed Lasers** *Lasers Surg. Med.* [s.l: s.n.].

NGUYEN, H.; MORGAN, D. A. F.; FORWOOD, M. R. Sterilization of allograft bone: effects of gamma irradiation on allograft biology and biomechanics. **Cell and Tissue Banking**, v. 8, n. 2, p. 93–105, 25 jun. 2007.

NOGUEIRAS-NIETO, L. et al. Hydration and N-acetyl-l-cysteine alter the microstructure of human nail and bovine hoof: Implications for drug delivery. **Journal of Controlled Release**, v. 156, n. 3, p. 337–344, 20 dez. 2011.

PANDHI, D.; VERMA, P. Nail avulsion: Indications and methods (surgical nail avulsion). **Indian Journal of Dermatology, Venereology, and Leprology**, v. 78, n. 3, p. 299, 2012.

PATEL, H. K. et al. Topical delivery of clobetasol propionate loaded microemulsion based gel for effective treatment of vitiligo: ex vivo permeation and skin irritation studies. **Colloids and surfaces. B, Biointerfaces**, v. 102, p. 86–94, 1 fev. 2013.

PATEL, M. M.; VORA, Z. M. Formulation development and optimization of transungual drug delivery system of terbinafine hydrochloride for the treatment of onychomycosis. **Drug Delivery and Translational Research**, v. 6, n. 3, p. 263–275, 29 jun. 2016.

POLAK, A. Mode of Action of Morpholine Derivatives. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 544, n. 1 Antifungal Dr, p. 221–228, dez. 1988.

POLAK, A. The past, present and future of antimycotic combination therapy. **Mycoses**, v. 42, n. 5–6, p. 355–370, jul. 1999.

QUINTANAR-GUERRERO, D. et al. The effect of keratolytic agents on the permeability of three imidazole antimycotic drugs through the human nail. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, v. 24, n. 7, p. 685–690, 1998.

RAJABALAYA, Rajan et al. Oral and transdermal drug delivery systems: role of lipid-based lyotropic liquid crystals. **Drug design, development and therapy**, p. 393–406, 2017.

RALPH DANIEL III, C. et al. Candida infection of the nail: role of Candida as a primary or secondary pathogen. **International Journal of Dermatology**, v. 37, n. 12, p. 904–907, dez. 1998.

REICHL, Stephan et al. Infected nail plate model made of human hair keratin for evaluating the efficacy of different topical antifungal formulations against *Trichophyton rubrum* in vitro. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 84, n. 3, p. 599–605, 2013.

REINEL, D. Topical Treatment of Onychomycosis with Amorolfine 5% Nail Lacquer: Comparative Efficacy and Tolerability of Once and Twice Weekly Use. **Dermatology**, v. 184, n. 1, p. 21–24, 1992.

REINITZER, Friedrich. Beiträge zur kenntniss des cholesterins. **Monatshefte für Chemie und verwandte Teile anderer Wissenschaften**, v. 9, n. 1, p. 421–441, 1888.

REPKA, M. A. et al. Nail morphology studies as assessments for onychomycosis treatment modalities. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 245, n. 1–2, p. 25–36, 1 out. 2002.

RICARDO A. GIANNONI; ORLANDO RODRIGUES JR. **Ressonância Paramagnética Eletrônica de Unhas Irradiadas: desafios para uma dosimetria em acidentes radiológicos**. 1º Congresso Brasileiro de Metrologia das Radiações Ionizantes, 2014.

RICCI, E. J. et al. Sustained release of lidocaine from Poloxamer 407 gels. **International journal of pharmaceutics**, v. 288, n. 2, p. 235–244, 2005.

RICHARDSON, M.; EDWARD, M. Model systems for the study of dermatophyte and non-dermatophyte invasion of human keratin. **Revista Iberoamericana de Micología**, v. 14, 2000.

RIZI, K. et al. A systematic approach to the formulation of anti-onychomycotic nail patches. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 127, p. 355–365, jun. 2018.

ROBERTS, D.; EVANS, E.; ALLEN, R. **Fungal nail disease**. London: Gower Medical, 1990.

ROBERTS, D. T. Prevalence of dermatophyte onychomycosis in the United Kingdom: Results of an omnibus survey. **British Journal of Dermatology**, v. 126, n. s39, p. 23–27, fev. 1992.

RUIZ, L. R. B.; CHIACCHIO, N. DI. **Manual de conduta nas onicomicoses: Diagnóstico e tratamento**. 2005.

RYDER, N. S.; LEITNER, I. In vitro activity of terbinafine (Lamisilr): An update. **Journal of dermatological treatment**, v. 9, n. sup1, p. S23–S28, 1998.

Safety and Pharmacokinetics of Terbinafine Hydrogen Chloride (HCl) Nail Lacquer in Patients With Onychomycosis - Tabular View - ClinicalTrials.gov. Disponível em: <<https://clinicaltrials.gov/ct2/show/record/NCT00691184>>. Acesso em: 1 dez. 2021.

SALTER, S. A. et al. Controlled nail trephination for subungual hematoma. **The American Journal of Emergency Medicine**, v. 24, n. 7, p. 875–877, nov. 2006.

SCHER, R. K. Onychomycosis: A significant medical disorder. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 35, n. 3, p. S2–S5, set. 1996.

SCHER, R. K.; BARAN, R. Onychomycosis in clinical practice: Factors contributing to recurrence. **British Journal of Dermatology, Supplement**, v. 149, n. 65, p. 5–9, 2003.

SCHULMAN, Jack H.; STOECKENIUS, Walter; PRINCE, Leon M. Mechanism of formation and structure of micro emulsions by electron microscopy. *The Journal of physical chemistry*, v. 63, n. 10, p. 1677-1680, 1959.

SEGAL, Rina et al. Treatment of Candida nail infection with terbinafine. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 35, n. 6, p. 958-961, 1996.

SHAH, V. H.; JOBANPUTRA, A. Enhanced Ungual Permeation of Terbinafine HCl Delivered Through Liposome-Loaded Nail Lacquer Formulation Optimized by QbD Approach. **AAPS PharmSciTech**, v. 19, n. 1, p. 213–224, 5 jan. 2018.

SHAHZAD, M. et al. Onychomycosis in Qassim region of Saudi Arabia: A clinicoaetiologic correlation. **Journal of Clinical and Diagnostic Research**, v. 8, n. 8, p. YC01, 2014.

SCHATZ, F. et al. Nail incorporation kinetics of terbinafine in onychomycosis patients. **Clinical and experimental dermatology**, v. 20, n. 5, p. 377-383, 1995.

SHIVAKUMAR, H. N. et al. Bilayered Nail Lacquer of Terbinafine Hydrochloride for Treatment of Onychomycosis. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 99, n. 10, p. 4267–4276, out. 2010.

SHIVAKUMAR, H. N. et al. Ungual and Transungual drug delivery. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, v. 38, n. 8, p. 901–911, ago. 2012.

SHIVAKUMAR, H. N.; REPKA, M. A.; NARASIMHA MURTHY, S. Transungual drug delivery: an update. **Journal of Drug Delivery Science and Technology**, v. 24, n. 3, p. 301–310, 2014.

SIDRIM, J. J. C.; ROCHA, M. F. G. **Micologia médica à luz de autores contemporâneos**. [s.l.] Guanabara Koogan, 2004.

SILVA, Sónia et al. Candida glabrata, Candida parapsilosis and Candida tropicalis: biology, epidemiology, pathogenicity and antifungal resistance. **FEMS microbiology reviews**, v. 36, n. 2, p. 288-305, 2012.

SINGAL, A.; KHANNA, D. Onychomycosis: Diagnosis and management. **Indian Journal of Dermatology, Venereology, and Leprology**, v. 77, n. 6, p. 659, 2011.

SINGH, Shri. Phase transitions in liquid crystals. **Physics Reports**, v. 324, n. 2-4, p. 107-269, 2000.

SINGH, R.; SINGH, D.; SINGH, A. Radiation sterilization of tissue allografts: A review. **World Journal of Radiology**, v. 8, n. 4, p. 355, 2016.

SIU, William J. Jo et al. Comparison of in vitro antifungal activities of efinaconazole and currently available antifungal agents against a variety of pathogenic fungi associated with onychomycosis. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 57, n. 4, p. 1610-1616, 2013.

SLEVEN, R. et al. Development of a novel in vitro onychomycosis model for the evaluation of topical antifungal activity. **Journal of Microbiological Methods**, v. 112, p. 73–75, 1 maio 2015.

SOUSA, G. D. et al. Biopharmaceutical Assessment and Irritation Potential of Microemulsions and Conventional Systems Containing Oil from Syagrus cearensis for Topical Delivery of Amphotericin B Using Alternative Methods. **AAPS PharmSciTech**, v. 18, n. 5, p. 1833–1842, 1 jul. 2017.

SOUZA, P. R. M. **Concordância entre o exame micológico direto e cultural em infecções ungueais dos pés por dermatófitos**. [s.l.] Universidade Federal do Rio Grande do Sul., 2007.

SREBRNIK, A. et al. Liver failure and transplantation after itraconazole treatment for toenail onychomycosis. **Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology**, v. 19, n. 2, p. 205–207, mar. 2005.

STUETZ, A.; PETRANYI, G. Synthesis and antifungal activity of (E)-N-(6,6-dimethyl-2-hepten-4-ynyl)-N-methyl-1-naphthalenemethanamine (SF 86-327) and related allylamine derivatives with enhanced oral activity. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 27, n. 12, p. 1539–1543, 1 dez. 1984.

STÜTTGEN, G.; BAUER, E. Bioavailability, Skin-and Nailpenetration of Topically Applied Antimycotics*. **Mycoses**, v. 25, n. 2, p. 74–80, fev. 1982.

STÜTZ, A. Allylamine Derivatives—a New Class of Active Substances in Antifungal Chemotherapy. **Angewandte Chemie International Edition in English**, v. 26, n. 4, p. 320–328, abr. 1987.

SUMIKAWA, M. et al. Effects of foot care intervention including nail drilling combined with topical antifungal application in diabetic patients with onychomycosis. **The Journal of Dermatology**, v. 34, n. 7, p. 456–464, jul. 2007.

TABOSA, M. A. M. et al. Microemulsion Formulations for the Transdermal Delivery of Lapachol. **AAPS PharmSciTech**, v. 19, n. 4, p. 1837–1846, 10 maio 2018.

TANRIVERDI, S. T.; ÖZER, Ö. Novel topical formulations of Terbinafine-HCl for treatment of onychomycosis. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 48, n. 4–5, p. 628–636, mar. 2013a.

TANRIVERDI, S. T.; ÖZER, Ö. Novel topical formulations of Terbinafine-HCl for treatment of onychomycosis. **European journal of pharmaceutical sciences : official journal of the European Federation for Pharmaceutical Sciences**, v. 48, n. 4–5, p. 628–636, 12 mar. 2013b.

TÄUBER, A.; MÜLLER-GOYMANN, C. C. In vitro permeation and penetration of ciclopirox olamine from poloxamer 407-based formulations - Comparison of isolated human stratum corneum, bovine hoof plates and keratin films. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 489, n. 1–2, p. 73–82, 15 jul. 2015.

TAVANTI, Arianna et al. Candida orthopsilosis and Candida metapsilosis spp. nov. to replace Candida parapsilosis groups II and III. **Journal of clinical microbiology**, v. 43, n. 1, p. 284–292, 2005.

Terbinafine hydrochloride | C₂₁H₂₆ClN - PubChem. Disponível em: <<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/5282481>>. Acesso em: 27 nov. 2021.

THAPA, R. K. et al. Development of ciclopirox nail lacquer with enhanced permeation and retention. **Archives of Pharmacal Research**, v. 39, n. 7, p. 953–959, 1 jul. 2016.

THATAI, P.; SAPRA, B. Transungual Gel of Terbinafine Hydrochloride for the Management of Onychomycosis: Formulation, Optimization, and Evaluation. **AAPS PharmSciTech**, v. 18, n. 6, p. 2316–2328, 23 ago. 2017.

THATAI, P.; SAPRA, B. Terbinafine hydrochloride nail lacquer for the management of onychomycosis: formulation, characterization and *in vitro* evaluation. **Therapeutic Delivery**, v. 9, n. 2, p. 99–119, fev. 2018.

THOMAS, J. et al. Toenail onychomycosis: an important global disease burden. **Journal of clinical pharmacy and therapeutics**, v. 35, n. 5, p. 497–519, out. 2010.

TORKAR, A.; KRISTL, J.; MURDAN, S. **Low-frequency ultrasound to enhance topical drug delivery to the nail**. Conference: AAPS Annual Meeting and Exposition. **Anais...**2007.

TORRES-RODRÍGUEZ, J. M.; LÓPEZ-JODRA, O. Epidemiology of nail infection due to keratinophilic fungi. **Revista Iberoamericana de Micología**, v. 17, p. 122–135, 2000.

TORTORA, G.; CASE, C. L.; FUNKE, B. R. **Microbiologia**. 8ª ed. São Paulo: Editora Atheneu, 2012.

TRAYNOR, M. J. et al. Effect of a novel penetration enhancer on the ungual permeation of two antifungal agents. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 62, n. 6, p. 730–737, jun. 2010.

TUNCAY TANRIVERDI, S. et al. Terbinafine hydrochloride loaded liposome film formulation for treatment of onychomycosis: *in vitro* and *in vivo* evaluation. **Journal of Liposome Research**, v. 26, n. 2, p. 163–173, 2 abr. 2016.

UZQUEDA, M. et al. Physicochemical characterization of terbinafine-cyclodextrin complexes in solution and in the solid state. **Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry**, v. 66, n. 3–4, p. 393–402, 15 abr. 2010.

VALDES, B. S. G. et al. Polyurethanes as new excipients in nail therapeutics. **Pharmaceutics**, v. 10, n. 4, 1 dez. 2018.

VAN DUYN GRAHAM, L.; ELEWSKI, B. E. Recent updates in oral terbinafine: its use in onychomycosis and tinea capitis in the US. **Mycoses**, v. 54, n. 6, p. e679–e685, nov. 2011.

VEJNOVIC, I.; HUONDER, C.; BETZ, G. Permeation studies of novel terbinafine formulations containing hydrophobins through human nails *in vitro*. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 397, n. 1–2, p. 67–76, set. 2010.

VERPAELE, A. et al. Nanofat Needling: A Novel Method for Uniform Delivery of Adipose-Derived Stromal Vascular Fraction into the Skin. **Plastic and reconstructive surgery**, v. 143, n. 4, p. 1062–1065, 1 abr. 2019.

VILLARS, V.; JONES, T. C. Clinical efficacy and tolerability of terbinafine (Lamisil)-a new topical and systemic fungicidal drug for treatment of dermatomycoses. **Clinical and Experimental Dermatology**, v. 14, n. 2, p. 124–127, mar. 1989.

VINTILOIU, Anda; LEROUX, Jean-Christophe. Organogels and their use in drug delivery—A review. *Journal of controlled release*, v. 125, n. 3, p. 179–192, 2008.

WALTERS, K. A.; FLYNN, G. L. Permeability characteristics of the human nail plate. **International Journal of Cosmetic Science**, v. 5, n. 6, p. 231–246, 1983.

WANKA, G.; HOFFMANN, H.; ULBRICHT, W. The aggregation behavior of poly-(oxyethylene)-poly-(oxypropylene)-poly-(oxyethylene)-block-copolymers in aqueous solution. *colloid and polymer science*, v. 268, p. 101–117, 1990.

WEITZMAN, I.; SUMMERBELL, R. C. The dermatophytes. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 8, n. 2, p. 240–259, abr. 1995.

WHITE, T. C. et al. Generating and Testing Molecular Hypotheses in the Dermatophytes. **Eukaryotic Cell**, v. 7, n. 8, p. 1238–1245, ago. 2008.

YUTANI, R. et al. Prominent efficiency in skin delivery of resveratrol by novel sucrose oleate microemulsion. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 68, n. 1, p. 46–55, 1 jan. 2016.

ZAIAS, N. Onychomycosis. **Dermatologic Clinics**, v. 3, n. 3, p. 445–460, 1 jul. 1985.

ZANARDI, D. et al. Avaliação dos métodos diagnósticos para onicomicose. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 83, n. 2, p. 119–124, abr. 2008.

APÊNDICE A – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

*Universidade Federal de Pernambuco
Departamento de Ciências Farmacêuticas
Núcleo de Desenvolvimento Farmacêutico e Cosmético*

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

(PARA MAIORES DE 18 ANOS OU EMANCIPADOS)

Convidamos o (a) Sr. (a) para participar como voluntário (a) da pesquisa **Melhorando o desempenho de tratamentos tópicos para doenças das unhas: visando a onicomicose, uma necessidade médica não atendida**, que está sob a responsabilidade da pesquisadora Dra. Leila Bastos Leal, residente na Avenida Boa Viagem, 5822/1201, Recife/ PE, CEP: 51011-000 – Fone: (81) 994516044 e-mail: leila.leal@nudfac.com.br.

Também participam desta pesquisa os pesquisadores: Juliana Kishishita, Asley Thalia Medeiros Souza, Maria Alice Maciel Tabosa, Elayne Karine Souto de Melo, Julia Celly de Moraes Carvalho. Respetivos telefones para contato: (81)99764-6594/ 99134-6373/ 99977-4774/ 99795-6781. Estão sob a orientação de Leila Bastos Leal.

Todas as suas dúvidas podem ser esclarecidas com o responsável por esta pesquisa. Apenas quando todos os esclarecimentos forem dados e você concorde com a realização do estudo, pedimos que rubrique as folhas e assine ao final deste documento, que está em duas vias. Uma via lhe será entregue e a outra ficará com o pesquisador responsável.

Você estará livre para decidir participar ou recusar-se. Caso não aceite participar, não haverá nenhum problema, desistir é um direito seu, bem como será possível retirar o consentimento em qualquer fase da pesquisa, também sem nenhuma penalidade.

INFORMAÇÕES SOBRE A PESQUISA:

Descrição da pesquisa:

As infecções fúngicas das unhas (onicomicoses) são doenças comuns. Infelizmente, ela é bastante difícil de tratar: os tratamentos locais têm baixa eficiência porque os medicamentos penetram mal na unha. As alternativas são tratamentos sistêmicos (medicamentos ingeridos por via oral), que expõem todo o corpo ao medicamento, o que resulta em efeitos adversos frequentes.

Nossa equipe de pesquisa está procurando novas formas farmacêuticas/medicamentos e diferentes formas de aplicação destes medicamento nas unhas.

Nossa hipótese é que a formulação racional resultará em uma grande melhoria na passagem dos fármacos através das unhas, possibilitando o desenvolvimento de medicamentos baratos para o tratamento eficiente das onicomicoses, evitando complicações do uso de medicamentos orais.

Os objetivos específicos são:

Desenvolver uma série de formulações de modo a:

- 1- garantir a solubilidade e estabilidade do ativo;
- 2- obter o suficiente na unha após aplicação para facilitar a difusão do fármaco;
- 3- desenvolver novos medicamentos para tratar doenças nas unhas.

Para fazer essas pesquisas, PRECISAMOS DE UNHAS HUMANAS pois, unhas de animais como boi ou porco, são diferentes das unhas humanas em sua estrutura e composição.

Essa é a razão para executar este corte e coleta de unhas. Para tanto, precisamos que participantes saudáveis doem as pontas das unhas (comprimento de 8 a 10 mm) para nossa pesquisa, para que possamos usar as unhas para fazermos experimentos que estudam a penetração de medicamentos antifúngicos.

Os participantes devem estar saudáveis e suas unhas não devem apresentar nenhuma doença, fragilidade, infecção ou descoloração. Isso é importante porque unhas doentes e saudáveis podem se comportar de maneira diferente.

A pesquisadora principal é professora das disciplinas de Biofarmacotécnica e Montagem de Farmácia Magistral, ambas do curso de graduação em Farmácia da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE). Desta forma, para evitar conflitos de interesses, os estudantes de graduação em farmácia, matriculados nestas disciplinas são excluídos deste estudo.

➤ Esclarecimento do período de participação do voluntário na pesquisa, início, término e número de visitas para a pesquisa.

Cabe a você decidir se deve ou não participar deste estudo. Se você concordar em participar, o procedimento será da seguinte maneira:

- 1-Você receberá uma cópia desta folha de informações para guardar;
- 2-Haverá um tempo (de 1 dia no mínimo à 2-3 meses) durante o qual você deixará as unhas crescerem. Observe que você pode escolher quantas (1 a 10) unhas, em qual mão e quais unhas você prefere deixar crescer. Durante todo esse tempo, você pode mudar de ideia sobre sua participação; você ainda pode retirar-se em qualquer momento da pesquisa sem apresentar um motivo;
- 3- Quando a borda livre das unhas atingirem o comprimento certo (8-10mm), e se você ainda quiser doá-las para a nossa pesquisa, entre em contato com a equipe de pesquisa. Você será solicitado a vir ao nosso laboratório (NUDFAC/ Departamento de Ciências Farmacêuticas) na Universidade Federal de Pernambuco e você receberá um formulário de consentimento para assinar. Após o consentimento informado, o pesquisador cortará a borda livre das unhas com uma tesoura de manicure padrão.
- 4- Suas unhas cortadas serão anônimas e identificadas com um código: Sujeito 1 / unha 1, Sujeito 1 / unha 2 e assim por diante. O pesquisador registrará a data da doação, seu nome, idade e sexo, o dedo e a mão de onde cada unha foi colhida e o uso de cosméticos (se relevante). Toda essa informação será mantida separadamente das unhas, para que não seja possível identificar o doador de cada amostra. O pesquisador manterá essas informações com segurança.
- 5-Depois que a coleta de unhas estiver concluída, você poderá deixar o laboratório e sua participação será considerada finalizada.
- 6-Você pode, se desejar, participar mais de uma vez do estudo.