

DEVANA FERREIRA SIMÕES

**APLICAÇÃO DE EUDRAGIT E NA OBTENÇÃO DE ESMALTE ANTIFÚNGICO
CONTENDO TIMOL**

BRASÍLIA, 2018

UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE

DEVANA FERREIRA SIMÕES

**APLICAÇÃO DE EUDRAGIT E NA OBTENÇÃO DE ESMALTE ANTIFÚNGICO
CONTENDO TIMOL**

**Dissertação apresentada como requisito parcial
para a obtenção do Título de Mestre em
Ciências da Saúde pelo Programa de Pós-
Graduação em Ciências da Saúde da
Universidade de Brasília.**

Orientadora: Prof.^a Dra. Lívia Cristina Lira de Sá Barreto

Coorientadora: Prof.^a Dra. Izabel Cristina Rodrigues da Silva

BRASÍLIA

2018

DEVANA FERREIRA SIMÕES

**APLICAÇÃO DE EUDRAGIT E NA OBTENÇÃO DE ESMALTE ANTIFÚNGICO
CONTENDO TIMOL**

**Dissertação apresentada como requisito parcial
para a obtenção do Título de Mestre em
Ciências da Saúde pelo Programa de Pós-
Graduação em Ciências da Saúde da
Universidade de Brasília.**

Aprovado em ____ / ____ / ____

BANCA EXAMINADORA

Prof.^a Dra. Lívia Cristina Lira de Sá Barreto (presidente)

Universidade de Brasília (UnB)

Prof. Dr. Marcílio Sérgio Soares da Cunha Filho

Universidade de Brasília (UnB)

Prof. Dr. Breno Noronha Matos

Centro Universitário Euroamericano (UNIEURO)

Dedico este trabalho aos meus pais, Vilma e Carmo, que sempre me apoiaram e auxiliaram na concretização dos meus sonhos.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, pelo dom da vida neste planeta me oportunizando o caminho em busca da evolução.

À minha família, pelo amor incondicional e pela convivência que me impulsionam a ser uma pessoa um pouco melhor cada dia.

À minha dileta orientadora Prof.^a Dra. Lívia Cristina Lira de Sá Barreto, pela confiança no meu potencial, pela paciência e dedicação em me orientar em mais um trabalho acadêmico, pela disponibilidade em transmitir seu conhecimento me proporcionando um precioso aprendizado, pela convivência amistosa vivenciada, pelo respeito e carinho a mim dispensados, minha eterna gratidão.

À minha coorientadora Prof.^a Dra. Izabel Cristina Rodrigues da Silva, pela atenção e disposição em me apoiar e auxiliar com seu conhecimento durante todo o tempo de convivência.

Ao Prof. Dr. Marcílio Sérgio Soares da Cunha Filho, por ter me proporcionado a oportunidade de aprender e trabalhar com sua equipe de pesquisa e por me honrar com sua participação na apreciação do meu trabalho.

Ao Prof. Dr. Breno Noronha Matos, pela consideração e disposição em aceitar compor a minha banca examinadora.

Ao Prof. Dr. Guilherme Martins Gelfuso, pela deferência em aceitar o encargo de suplente para a comissão examinadora da minha dissertação.

Ao Prof. Ms. Daniel Oliveira Freire, pelo apoio e empenho em transmitir seus conhecimentos que foram imprescindíveis para a realização desta pesquisa.

À minha amiga e professora de idiomas Valéria Fragozo, que com seu conhecimento e apoio me auxiliou ingressar no mestrado.

A todos os queridos amigos e colegas do LTMAC, pelo acolhimento e convivência, pelos conhecimentos compartilhados, pelo apoio e auxílio, enfim, por tudo que me proporcionaram para que este trabalho fosse realizado, especialmente Paula Martins, Maíra Nunes, Lorena Malaquias, Luana Afiune e Maíra Teixeira.

Aos estimados Felipe de Queiroz Pires, Natane Castelo Branco Duarte, Ludmila Alvim Gomes Pinho e Ricardo Ferreira Nunes, pelo empenho e prontidão imensuráveis em me ajudar sempre que precisava, por compartilhar seus conhecimentos que muito me auxiliaram na realização deste trabalho, pela

dedicação e zelo a mim dispensados, pelas palavras de carinho e ânimo que tanto me confortaram nas horas difíceis.

À querida amiga de projeto Jessika Layane Rocha, por todo o auxílio, prestatividade e companheirismo dentro e fora de laboratório, pelas vivências e conhecimentos compartilhados, pela amizade e carinho.

Aos queridos amigos do Núcleo de Farmácia Viva do DF, em especial Nilton Luz Netto Júnior, pelo apoio, compreensão e carinho.

Aos meus prezados amigos de convivência social e laboral cotidiana, pela amizade e apoio.

À Renata Colenci da Evonik, pelo fornecimento dos copolímeros e disponibilidade para esclarecimento técnico.

À equipe do Laboratório de Tecnologia Aplicada à Farmácia da Faculdade de Ceilândia, pela ajuda prestada.

Ao Centro de Nanobiotecnologia na pessoa do Hermano, pelo auxílio fornecido ao trabalho.

À Faculdade LS, pelo auxílio prestado à pesquisa.

À Universidade de Brasília, por propiciar a oportunidade de realização deste trabalho.

“O que vale na vida não é o ponto de partida e sim a caminhada.

Caminhando e semeando, no fim terás o que colher.”

(Cora Coralina)

RESUMO

O presente estudo teve como objetivo o desenvolvimento de uma formulação de esmalte antifúngico a base de copolímero acrílico e timol contendo agentes solubilizantes. Foi avaliada a compatibilidade e interação entre os constituintes das formulações através dos ensaios de Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC) e Espectroscopia no Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR). Os esmaltes foram desenvolvidos a partir de um desenho de mistura, com obtenção de 7 formulações. As características físico-químicas e microbiológicas dos produtos foram avaliadas através dos ensaios de tempo de secagem, microscopia óptica, resistência à água, liberação *in vitro* e testes antifúngicos com os microrganismos *Candida albicans* e *Trichophyton mentagrophytes*. A formulação de esmalte que continha a combinação de todos os excipientes solubilizantes, obteve os melhores resultados, pois apresentou boa compatibilidade entre os insumos farmacêuticos e o fármaco, seu tempo de secagem foi adequado conforme a literatura, e a imagem microscópica do seu filme mostrou ser liso e homogêneo, enquanto que os demais filmes obtidos apresentaram rugosidades, aspecto estético indesejável para esse tipo de produto. Quanto à resistência à água, a combinação dos agentes solubilizantes proporcionou maior perda de massa, favorecendo a remoção do esmalte sem necessidade de uso de solventes orgânicos. O estudo de liberação demonstrou que todos os esmaltes elaborados apresentaram cinética de liberação controlada, porém com maior porcentagem de fármaco liberado apenas no esmalte contendo todos os agentes solubilizantes. Os ensaios microbiológicos realizados comprovaram a efetividade microbiológica do timol e seu efeito sinérgico com os insumos presentes nas fórmulas.

Palavras-chave: pré-formulação; esmalte antifúngico; Eudragit®; timol; onicomicose.

ABSTRACT

The present study aimed to develop an antifungal nail lacquer formulation prepared with acrylic copolymer and thymol containing solubilizing agents. The compatibility and interaction between the constituents of the formulations were evaluated using the differential scanning calorimetry (DSC) and infrared spectroscopy (FTIR) assays. A mixture design was used to develop the nail lacquer obtaining 7 formulations. The physicochemical and microbiological characteristics of the products were evaluated by determining drying time, optical microscopy, water resistance, *in vitro* release study and antifungal tests with the microorganisms *Candida albicans* and *Trichophyton mentagrophytes*. The nail lacquer formulation containing all the solubilizing agents, showed the best results when it revealed compatibility between excipients and thymol, its drying time was adequate according to literature, and the microscopic image of its film showed to be smooth and homogeneous, while the other obtained films presented rugosities, an undesirable aesthetic aspect for this type of product. About water resistance, the combination of solubilizing agents provided greater mass loss, which facilitates the removal of the nail lacquer without using organic solvents. The *in vitro* release study showed that all nail lacquer formulations presented controlled release kinetics, but only the formulation containing all the solubilizing agents presented a higher percentage of released drug. The microbiological assays performed proved the microbiological effectiveness of thymol and its synergistic effect with the inputs present in the formulations.

Keywords: preformulation; antifungal nail lacquer; Eudragit®; thymol; onychomycosis.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Ilustrações da anatomia ungueal (7).....	19
Figura 2 - Estrutura molecular do timol (31).....	25
Figura 3 – Estrutura molecular dos copolímeros acrílicos Eudragit® (42, 43).....	27
Figura 4 - Desenho de mistura para desenvolvimento de esmalte de Eudragit® E e timol.....	35
Figura 5 – Fotografia da célula de difusão do tipo Franz modificada.	38
Figura 6 – Fotografia dos cultivos de <i>Candida albicans</i> (A) e <i>Trichophyton mentagrophytes</i> (B) em meio ágar Sabouraud-dextrose.....	39
Figura 7 – Fotografia da cabine de segurança biológica.....	40
Figura 8 - Fotografia da placa para o teste de difusão em poço.	41
Figura 9 – Curvas de DSC do timol puro, das misturas físicas (M1 a M7) e das formulações dos esmaltes (F1 a F7).	45
Figura 10 – Espectros em infravermelho da mistura física M7 e da formulação de esmalte F7.....	46
Figura 11 – Fotografia dos esmaltes antifúngicos contendo timol.....	46
Figura 12 – Fotografias das imagens microscópicas dos filmes das formulações desenvolvidas, da base de Eudragit® E 100 e de base comercial.....	50
Figura 13 – Fotografias das placas com os halos de inibição de timol para <i>Candida albicans</i>	59
Figura 14 – Fotografias representativas das placas com os halos de inibição para <i>Trichophyton mentagrophytes</i> . F6 formulação de esmalte de Eudragit® E contendo timol e agentes solubilizantes (HPBCD e glicerina).	60

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 – Tempo de secagem dos esmaltes de Eudragit® E contendo timol obtidos no desenho de mistura.	49
Gráfico 2 – Perda de massa (%) das formulações observada no ensaio de resistência à água. As barras representam as médias da porcentagem de perda de massa das formulações e as barras de erro, os desvios-padrão.	51
Gráfico 3 – Representação gráfica da curva analítica obtida em CLAE-UV para soluções metanólicas de timol.....	52
Gráfico 4 - Representação gráfica da curva analítica obtida em CLAE-UV para soluções tampão fosfato pH 7,4 com timol.....	53
Gráfico 5 – Perfis de liberação in vitro das formulações de esmalte e da solução controle contendo timol. Os pontos centrais representam as médias da % liberada das replicatas, e as barras de erro representam o desvio padrão.....	55
Gráfico 6 – Gráfico de contorno obtido para variável liberação do desenho de mistura com os agentes solubilizantes do esmalte antifúngico de Eudragit® E contendo timol: ácido cítrico (x), glicerina (y) e HPBCD (z).	56
Gráfico 7 – Atividade microbiológica quanto à espécie <i>Candida albicans</i> . As barras representam as médias do halo de inibição (mm) e as barras de erro, os desvios-padrão.	59
Gráfico 8 – Gráfico de contorno obtido para variável ensaio microbiológico com <i>Candida albicans</i> do desenho de mistura com os agentes solubilizantes do esmalte antifúngico de Eudragit® E contendo timol: ácido cítrico (x), glicerina (y) e HPBCD (z).	59
Gráfico 9 – Atividade microbiológica quanto à espécie <i>Trichophyton mentagrophytes</i> . As barras representam as médias do halo de inibição (mm) e as barras de erro, os desvios-padrão.....	61
Gráfico 10 – Gráfico de contorno obtido para variável ensaio microbiológico com <i>Trichophyton mentagrophytes</i> do desenho de mistura com os agentes solubilizantes do esmalte antifúngico de Eudragit® E contendo timol: ácido cítrico (x), glicerina (y) e HPBCD (z).....	61

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Composição do esmalte e função de seus insumos.....	33
Quadro 2 - Composição em % (P/V) dos esmaltes à base de Eudragit® e timol a partir de desenho de mistura.....	35
Quadro 3 – Caracterização das formulações.....	47

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Fármacos disponíveis no Brasil para tratamento tópico da via ungueal.	22
Tabela 2 – Análise estatística da permeabilidade ou resistência à água.....	51
Tabela 3 – Doseamento do timol nas formulações.....	53
Tabela 4 – Resultados das médias finais de liberação do timol das formulações e do controle em 24h.....	54
Tabela 5 – Linearização dos perfis de liberação ajustados de acordo com o coeficiente de correlação de Pearson para as formulações F1 a F7.....	57
Tabela 6 – Atividade microbiológica quanto à espécie <i>Candida albicans</i>	58

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANOVA	Análise de variância
ATR	Reflexão Total Atenuada
CLAE	Cromatógrafo Líquido de Alta Eficiência
DSC	Calorimetria Exploratória Diferencial
FDA	<i>Food and Drug Administration</i> (Agência que regula alimentos e medicamentos nos Estados Unidos da América)
FIOCRUZ	Fundação Oswaldo Cruz
FTIR	Espectroscopia no Infravermelho com Transformada de Fourier
HPBCD	2-hidroxipropil-beta-ciclodextrina
IFA	Insumo farmacêutico ativo
INCQS	Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde
LTMAC	Laboratório de Tecnologia em Medicamentos, Alimentos e Cosméticos
NHPID	<i>Natural Health Products Ingredients Database</i> (Plataforma de dados de saúde do Governo do Canadá)
OMS	Organização Mundial da Saúde
PCL	Poli- ϵ -caprolactona
pH	Potencial Hidrogeniônico
TML	Timol
UnB	Universidade de Brasília
UR	Umidade relativa do ar
UV	Ultravioleta

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	17
1.1	ANATOMIA E FISIOLOGIA DA UNHA	18
1.2	PRINCIPAIS ENFERMIDADES NAS UNHAS E TRATAMENTOS	19
1.2.1	<i>Candida albicans</i> e sua Associação com Onicomicoses	24
1.2.2	<i>Trichophyton mentagrophytes</i> e sua Associação com Onicomicoses	24
1.3	TIMOL	25
1.4	COPOLÍMERO ACRÍLICO: EUDRAGIT®	27
1.5	ESMALTES UNGUEAIS	30
2	OBJETIVOS	32
2.1	OBJETIVO GERAL	32
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	32
3	MÉTODOS	33
3.1	MATERIAIS	33
3.2	CARACTERIZAÇÃO E COMPATIBILIDADE DOS INSUMOS	34
3.2.1	Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC)	34
3.2.2	Espectroscopia no Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR)	34
3.3	ELABORAÇÃO DAS FORMULAÇÕES DE ESMALTES E MISTURAS FÍSICAS	34
3.4	CARACTERIZAÇÃO DAS FORMULAÇÕES DE ESMALTES À BASE DE TIMOL E EUDRAGIT® E	35
3.4.1	Características Estéticas da Solução	36
3.4.2	Determinação do pH da Solução	36
3.4.3	Características Estéticas do Filme Após Secagem	36
3.4.4	Tempo de Secagem	36
3.4.5	Microscopia Óptica	36
3.4.6	Permeabilidade ou Resistência à Água	37
3.4.7	Doseamento	37
3.4.8	Ensaio de Liberação em Células de Difusão	38
3.4.9	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência	39
3.5	ATIVIDADE MICROBIOLÓGICA	39
3.5.1	Teste de Difusão em Poço	40
3.6	ANÁLISE ESTATÍSTICA	42
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	43
4.1	CARACTERIZAÇÃO E COMPATIBILIDADE DOS INSUMOS	43

4.1.1	Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC).....	43
4.1.2	Espectroscopia no Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR)	45
4.2	CARACTERIZAÇÃO DAS FORMULAÇÕES DE ESMALTES À BASE DE TIMOL E EUDRAGIT® E	46
4.2.1	Características Estéticas da Solução	47
4.2.2	Determinação do pH da Solução	47
4.2.3	Características Estéticas do Filme Após Secagem	48
4.2.4	Tempo de Secagem	48
4.2.5	Microscopia Óptica.....	49
4.2.6	Permeabilidade ou Resistência à Água	50
4.2.7	Doseamento	52
4.2.8	Liberção em Células de Difusão.....	53
4.3	ATIVIDADE MICROBIOLÓGICA.....	57
4.3.1	Teste de Difusão em Poço	57
5	CONCLUSÃO	62
	REFERÊNCIAS.....	64

1 INTRODUÇÃO

A onicomicose refere-se às infecções fúngicas que acometem as unhas, podendo ser causadas por leveduras, fungos dermatófitos e ainda pelos fungos filamentosos não dermatófitos. Dentre os agentes causadores das onicomicoses prevalecem as leveduras e os fungos filamentosos dos gêneros *Candida* spp. e *Trichophyton* spp. respectivamente, principalmente as espécies *Candida albicans* e *Trichophyton mentagrophytes* (1, 2).

Os tratamentos usuais para onicomicose compreendem as terapias tópica, sistêmica e a combinação de ambas. O tratamento tópico geralmente é indicado como profilaxia após a terapia sistêmica e ainda pode auxiliar como paliativo. Para a erradicação da enfermidade faz-se o uso de medicamentos antifúngicos administrados via oral (1, 3).

Os medicamentos de uso tópico disponíveis no Brasil são nas formas farmacêuticas de esmalte como os que contêm os fármacos ciclopirox e amorolfina, e de solução contendo o fármaco tioconazol (1, 3, 4).

Desta forma, sempre há a busca por fármacos de origem natural para tratar as enfermidades, e no caso da onicomicose, tem-se no timol um fármaco de escolha em virtude do seu potencial antifúngico, sendo assim uma alternativa para tal fim. O timol é um monoterpene de estrutura aromática que embora seja produzido sinteticamente, pode ser obtido de fontes naturais como de óleos essenciais de tomilho (*Thymus vulgaris*) e alecrim pimenta (*Lippia organoides*) (5).

Neste estudo, interessou-se desenvolver um esmalte medicamentoso para tratamento das onicomicoses, e para tanto, além do timol como fármaco escolhido, buscou-se outros componentes para elaborar a formulação do esmalte.

Os esmaltes convencionais geralmente se constituem de solventes, polímeros formadores de filme, solubilizantes, plastificantes e corantes (6). Para a elaboração de esmalte medicamentoso utiliza-se os mesmos componentes adicionando um fármaco antifúngico e excetuando, neste caso, o agente corante.

Assim, para este estudo, elencou-se como base formadora de filme o copolímero Eudragit® E, como agentes solubilizantes os excipientes 2-hidroxipropil-beta-ciclodextrina, ácido cítrico e glicerina, que também apresentam as funções de conservante, plastificante e agente umectante respectivamente. O copolímero Eudragit® E foi elencado uma vez que apresenta características adequadas para

esta forma farmacêutica, as quais são apresentadas adiante, bem como não existe no mercado brasileiro esmalte medicamentoso que o contenha. Os demais excipientes foram escolhidos conforme suas funções e características propícias para a forma farmacêutica esmalte, também descritas na revisão de literatura à continuação.

Mediante todo o exposto e a escassez de estudos sobre a aplicação do copolímero Eudragit® E em preparações ungueais, há que se buscar formulações inovadoras que promovam maior eficácia do fármaco a fim de melhorar sua efetividade na terapêutica, sendo então de grande importância a realização deste trabalho.

1.1 ANATOMIA E FISIOLOGIA DA UNHA

A unha é uma modificação da epiderme, semelhante a uma crosta que corresponde ao casco ou garra em outros animais. Esse anexo cutâneo presente nos dedos das mãos e dos pés serve como ferramenta que permite a manipulação motora fina, sensibilidade tátil e função protetora (1, 2, 7, 8).

As unhas são constituídas de células queratinizadas, que como os cabelos, são na maior parte matéria inerte. A queratina é uma proteína fibrosa, rica em cisteína, cujas pontes dissulfeto garantem sua estabilidade. Ela pode ser agrupada de duas formas, a dura, quando tem muitas pontes dissulfeto, e a mole, quando tem menos dessas ligações e apresenta mais grupos sulfidríla. A queratina dura é encontrada nas células epidérmicas típicas: primeiro por ser mais rígida e durável e também por não escamar (1, 3, 7, 9, 10).

A unha está assentada em um vale de epiderme chamado leito ungueal (*cf.* Figura 1) que contém apenas as camadas mais profundas da epiderme, pois a própria unha corresponde às camadas superficiais queratinizadas (1, 3, 7, 10).

Uma unha possui as seguintes partes: a matriz ungueal; a raiz, localizada sob a dobra da pele; a lâmina ou placa ungueal, aderente ao leito ungueal na sua porção inferior; as bordas laterais; e a borda livre (*cf.* Figura 1) (2, 7, 8, 11).

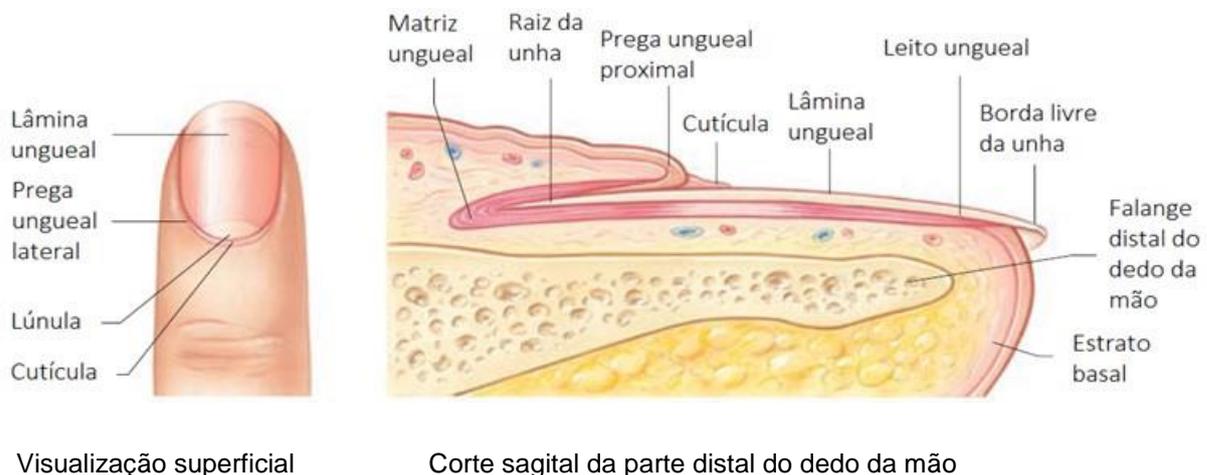
A matriz ungueal é uma área semilunar de células epiteliais proliferativas, a parte de crescimento ativo da unha, inserida na prega ungueal posterior e visível parcialmente em área mais clara, chamada lúnula. Esta prega posterior apresenta um prolongamento da camada córnea que recobre a porção proximal da unha,

cutícula ou eponíquio, aderente à lâmina ungueal (7, 8, 11). Tais estruturas são importantes porque devido a processos inflamatórios podem ser destacadas das unhas. A nutrição da matriz ungueal é feita por uma rica rede vascular que se constitui de duas artérias digitais (8, 11), as quais junto com os capilares na derme subjacente dão às unhas um aspecto róseo (2, 7, 12).

A lâmina ungueal é formada, fundamentalmente, pela matriz ungueal (3, 11), mas há participação secundária do leito ungueal nesse processo (11).

As bordas da unha têm pregas cutâneas sobrepostas, chamadas de pregas ungueais (3, 7, 8). Cada unha possui duas pregas laterais que demarcam as bordas da unha, e a parte visível termina em borda livre, tornando-se branca neste local devido ao contato com o ar (3, 8, 13).

A espessura das unhas varia de 0,5 a 0,75 mm e o crescimento se dá cerca de 0,1 mm por dia nos dedos das mãos, enquanto as dos pés crescem em ritmo mais lento. O crescimento das unhas é maior durante o dia e nas pessoas do sexo masculino, sendo influenciado também por doenças sistêmicas e fatores locais, como obesidade, hiper ou hipotireoidismo, danos à matriz ungueal, doenças infecciosas, faixa etária, estações do ano e períodos do dia (2, 13).



Visualização superficial

Corte sagital da parte distal do dedo da mão

Figura 1 - Ilustrações da anatomia ungueal (7).

1.2 PRINCIPAIS ENFERMIDADES NAS UNHAS E TRATAMENTOS

As enfermidades que mais acometem as unhas são a onicomicose e a psoríase ungueal (6, 14, 15, 16), sendo a primeira uma das dermatofitoses mais

prevalentes afetando de 7 a 10 % da população, e responsável por 15 a 40 % das alterações ungueais (4, 15).

Onicomicose é uma infecção fúngica na placa e/ou no leito ungueal causada na sua maioria, de 90-95%, por dermatófitos, e de 5-10% por leveduras e fungos filamentosos não dermatófitos (6, 15).

Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), cerca de 25% da população mundial é afetada pelos fungos dermatófitos. Assim, há a estimativa de que 30 a 70% dos adultos portam assintomaticamente esses patógenos e que a incidência dessa patologia fúngica aumente com a idade. Esses fungos estão classificados em três gêneros conforme a formação e morfologia das suas estruturas de reprodução assexuada (conídios), que são *Trichophyton*, *Microsporum* e *Epidermophyton*, sendo que dentre os patógenos humanos 30 espécies de fungos dermatófitos já foram identificados (17).

A transmissão das dermatofitoses ocorre pelo contato direto com humanos infectados e animais, ou indiretamente por fômites contaminados, variando as formas clínicas de acordo com a espécie e o local anatômico acometido. Nas onicomicoses pode ocorrer espessamento da unha, aparecimento de manchas brancas, descolamento das bordas, espessamento e ainda distrofia total das unhas. Apesar das infecções originadas por dermatófitos não ultrapassarem as regiões superficiais da epiderme, em pacientes imunocomprometidos esses fungos podem comportar-se de maneira invasiva, ocasionando infecção profunda e disseminada (17).

A onicomicose é clinicamente classificada conforme o local onde inicia a infecção: onicomicose subungueal distal, onicomicose subungueal proximal, onicomicose superficial branca e onicomicose distrófica total (6, 15).

Para diagnosticar a onicomicose é necessária a realização do exame micológico, tanto microscópico direto como o ensaio de cultura (4, 15, 18).

Visando o sucesso do tratamento, o diagnóstico etiológico correto é primordial, assim, alguns cuidados precisam ser observados durante a coleta e processamento do material. Portanto, faz-se a limpeza prévia do local de coleta com solução hidroalcoólica 70% e instrumental previamente esterilizado (18, 19, 20). A quantidade de material e a escolha do local da coleta devem ser de acordo com a forma clínica de onicomicose, pois variam conforme o tipo: distal e lateral, na transição parte sadia-alterada; superficial branca, na lâmina ungueal; proximal

subungueal, no leito ungueal proximal; distrófica total, no leito ungueal por curetagem e onicomicose por candidíase na prega ungueal. O exame micológico direto é realizado após a clarificação das escamas, material coletado, com solução aquosa de hidróxido de potássio e dimetil sulfóxido (15, 19).

Além do diagnóstico preciso, vários fatores interferem na escolha do melhor método terapêutico e no resultado final do tratamento, dentre eles: fatores inerentes à idade, em especial aos grupos etários abaixo de 10 anos e acima de 60 anos, que necessitam de auxílio; o gênero, pela influência estética e/ou atividades laborais; o nível sócio-econômico, que determina o acesso aos tratamentos disponíveis; os hábitos e *hobbies* dos pacientes, que podem auxiliar ou prejudicar a efetividade da terapêutica (15, 19, 21, 22).

Os tratamentos podem se estender por longos períodos e o custo dos medicamentos utilizados para as onicomicoses costuma ser elevado. Necessitando, portanto, discussão profunda da terapêutica com o paciente (15, 22).

Conforme a Sociedade Brasileira de Dermatologia a terapêutica das onicomicoses baseia-se em três tratamentos diferentes, como a terapia tópica (incluindo avulsão da lâmina ungueal afetada), terapia sistêmica e terapia combinada (15, 20).

O tratamento via tópica é indicado para os casos de onicomicose superficial branca ou quando a matriz ungueal não está envolvida, caso contrário este tratamento é insuficiente. Além disso, é o mais recomendado nas profilaxias de recidiva após tratamento sistêmico. Apresenta como vantagem o baixo nível de efeito sistêmico e interação medicamentosa (4, 15, 20).

O fármaco ideal é o que possui penetração efetiva e alta concentração na lâmina ungueal, sendo a apresentação em esmalte a que mais atinge eficientemente a concentração inibitória mínima. Já as formas farmacêuticas soluções e cremes se mostram com pouca efetividade, porém de baixo custo (4, 15, 22).

A avulsão mecânica, química ou cirúrgica tem como finalidade o debridamento da placa ungueal para diminuir a massa crítica fúngica, que assim permite uma maior concentração e biodisponibilidade do fármaco nas camadas mais profundas da lâmina e do leito ungueais (15).

A terapia sistêmica, com administração via oral de medicamentos antifúngicos, é voltada para os casos que envolvem a matriz ungueal, sendo

considerada mais efetiva, embora apresente riscos de interações medicamentosas e efeitos colaterais (1, 14, 15).

A combinação das terapias tópica e sistêmica possibilita as chances de cura ou mesmo diminui o tempo do tratamento, apesar de não existirem ainda trabalhos que comprovem isso. Tem indicação igual à terapia sistêmica, porém apresenta a vantagem de ser mais efetiva se comparada à monoterapia oral, pois favorece um efeito sinérgico (4, 15, 22).

A tabela 1 apresenta nome comercial, posologia e mecanismo de ação de alguns produtos disponíveis no mercado brasileiro para tratamento tópico da via ungueal.

Tabela 1 – Fármacos disponíveis no Brasil para tratamento tópico da via ungueal

Fármaco	Nome comercial	Posologia	Mecanismo de ação
Amorolfina 5%	Loceryl Esmalte®; Dermoceryl; Lomytrat; Onicoryl; Onimorf.	1x/semana	Fungistático e fungicida com ampla cobertura para dermatófitos, leveduras, fungos demáceos e fungos dimórficos. Não há cobertura bacteriana, exceto <i>Actinomyces</i> .
Ciclopirox Olamina 8%	Ciclopirox Olamina Solução Micolamina Esmalte®	Solução: 2x/dia Esmalte: 1x/dia 1x/semana	Inibe o crescimento de dermatófitos, leveduras patogênicas, <i>M. Furfure</i> bactérias gram-positivas e gram-negativas. Alguns estudos têm demonstrado maior penetração na lâmina ungueal do que outros antifúngicos, possibilitando melhores resultados.
Ciclopirox 80mg/g Esmalte	Fungirox Esmalte®	1º mês: em dias alternados 2º mês: 2x/semana 3º mês em diante: 1x/semana	
Tioconazol Solução 28%	Tralen®	2x/dia	Ampla espectro com atividade antifúngica contra dermatófitos, leveduras e outros fungos patogênicos, e antibacteriana contra gram-positivos, incluindo <i>Staphylococcus</i> e <i>Streptococcus spp.</i> e gram-negativos. Ação contra dermatófitos e leveduras. Pode atuar como fungicida ou fungistática, dependendo da espécie.
Terbinafina 1% gel	Lamisil®	1 ou 2x/dia	

Fonte: adaptado de Steiner *et. al.* 2014 (4).

Já a psoríase é uma doença inflamatória crônica da pele que se caracteriza pelo espessamento e descamação da epiderme como resultado da divisão celular excessiva nas camadas basais (6). Sua causa é desconhecida, mas sabe-se que pode estar associada ao sistema imunológico, às interações com o meio ambiente e à suscetibilidade genética (14). Afeta entre 1 e 3% da maioria das populações,

sendo mais comum na Europa e na América do Norte. Observa-se que 80% dos pacientes com psoríase cutânea também sofrem de psoríase ungueal, enquanto 1 a 5% dos pacientes com psoríase ungueal não apresentam qualquer doença cutânea evidente (6).

Então, a psoríase ungueal acomete qualquer porção da unidade ungueal e dos tecidos periungueais, fazendo com que a unha cresça de forma anormal, engrosse, escame, mude de cor e se deforme, chegando até descolar do leito ungueal (1, 14).

A psoríase ungueal raramente é a manifestação inicial da psoríase, o comum é ocorrer nas unhas durante a evolução da doença, particularmente em casos moderados a graves de longa duração (1, 4).

Para diagnosticar esta enfermidade ungueal, raramente são realizados exames complementares, porém a biopsia ungueal e o estudo histopatológico de recorte da lâmina ungueal conhecido como *clipping*, podem ser realizados em situações que o diagnóstico é duvidoso (1).

O exame micológico direto e a cultura devem ser feitos devido à frequência da concomitância com infecção fúngica e, ocasionalmente bacteriana, observando as respectivas implicações terapêuticas, sendo que as alterações clínicas observadas na psoríase ungueal vão depender da localização da doença, se está afetando a matriz ou o leito ungueal (1, 4).

Geralmente o tratamento da psoríase ungueal não é prioritário, pois é considerado lento e pouco eficaz e tal enfermidade é habitualmente persistente e resistente às terapêuticas. O tratamento varia conforme as alterações ungueais encontradas, levando em conta que certos tratamentos são mais eficazes em algumas, porém é imprescindível a adesão do paciente. Assim, vale ressaltar que a terapia sistêmica é mais eficaz que a tópica, devendo ser utilizada nos casos mais severos de psoríase ungueal (23).

A psoríase ungueal não é apenas problema de ordem estética, uma vez que afeta intensamente a qualidade de vida do paciente na realização de funções básicas do dia a dia e no relacionamento social, levando assim a um grande impacto psicológico (1).

1.2.1 *Candida albicans* e sua Associação com Onicomicoses

O gênero *Candida* spp. é composto por fungos unicelulares, as leveduras, destacando-se pela alta frequência de infecção e colonização do hospedeiro humano (24). Dentre as espécies do gênero, a mais proeminente é a *Candida albicans* em virtude de serem fungos oportunistas, que habitam a microbiota do corpo humano sem causar doença em indivíduos saudáveis. Entretanto, o organismo humano quando em desequilíbrio biológico, pode sofrer a invasão e multiplicação destes fungos nos tecidos, gerando infecções (25).

Este gênero é muito importante quando se refere às onicomicoses. Em uma pesquisa feita com manipuladores de alimentos em Recife, de forma direta ou indireta, entre os 50 trabalhadores participantes, 30 apresentaram resultados positivos de colonização desse tipo de fungo em suas amostras ungueais. E destes, 26 tiveram crescimento de *Candida albicans*, representando 86% dos trabalhadores com resultados positivos. Em outro estudo há o relato que dentre 100 pacientes com candidíase, 60% apresentavam as unhas como região afetada, tendo a espécie *Candida albicans* como a de maior frequência no total dos casos (26, 27).

1.2.2 *Trichophyton mentagrophytes* e sua Associação com Onicomicoses

O *Trichophyton* spp. é o gênero de fungos mais frequente nos isolados de material clínico acometendo pele, cabelo e unhas, por serem queratinofílicos, isto é, afetam tecidos queratinizados, utilizando estes tecidos como meio de nutrição. Em Fortaleza, um estudo realizado em um período de três anos relatou o isolamento de *Trichophyton* spp. em 12,99% dos casos de onicomicose (17).

Aproximadamente 90% dos casos reportados de infecções nas unhas dos dedos dos pés e 50% nas unhas dos dedos das mãos são devidos aos dermatófitos *Trichophyton rubrum* e *Trichophyton mentagrophytes*. Assim, estas espécies se destacam como alguns dos principais agentes causadores de dermatofitoses humanas (28).

1.3 TIMOL

O timol (TML), 2-isopropil-5-metil-fenol, é um monoterpene de estrutura aromática, caracteristicamente cristalino e incolor, apresentando fórmula molecular $C_{10}H_{14}O$ (cf. Figura 2), peso molecular de 150,22 g/mol, ponto de ebulição em torno de 233 °C, intervalo de fusão entre 48 – 51 °C, constante de dissociação de 10,6, densidade relativa de 0.965 g/cm³ a 25 °C e hidrossolubilidade de 1 g/L a 25 °C (5, 29, 30, 31). É solúvel em clorofórmio, etanol (95%), éter, óleos essenciais, óleos fixos e gorduras, porém moderadamente em glicerina (31).

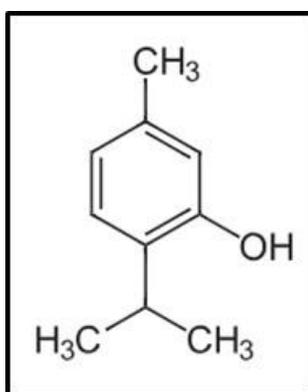


Figura 2 - Estrutura molecular do timol (31).

O timol é afetado pela luminosidade, por isso deve ser armazenado em recipientes bem fechados e resistentes à luz, em local fresco e seco (31).

É encontrado em algumas plantas medicinais como *Thymus vulgaris* (tomilho) e *Lippia origanoides* (alecrim pimenta) (5). Na antiguidade, o tomilho por ser rico em timol, era extensivamente utilizado para aromatizar alimentos, como planta medicinal, além de ser empregado em procedimentos de mumificação (30).

Foi descoberto somente em 1719 por Gaspar Neumann e sintetizado em 1842 por Von M. Lallemand. Em 1980 foi publicada a primeira estrutura cristalográfica do timol por Alain Perrin Thozet e M. Perrin (30).

Conforme a literatura, o timol apresenta um expressivo potencial antisséptico, uma vez que é utilizado para inibir a proliferação de microrganismos há muitos anos, por isso seu largo uso nas indústrias farmacêutica e de higiene pessoal em diversas formulações, como por exemplo, é comum empregá-lo em cremes dentais e enxaguantes bucais, pomadas descongestionantes e pastilhas que aliviam a tosse e a irritação na garganta (5, 31).

A partir de óleos essenciais vários agentes antibacterianos foram identificados, dentre eles o timol, que supostamente teve um bom desempenho em comparação com outros agentes antimicrobianos, dada a sua estrutura fenólica (5, 32). Ele é capaz de inibir bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, incluindo as potenciais cepas patogênicas de *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* e *Staphylococcus aureus* (32).

Externamente, o timol tem sido utilizado em pó para o tratamento de infecções fúngicas da pele, bem como demonstrou ter efeitos antifúngicos sinérgicos quando associado ao cetoconazol (33). Em estudos feitos por Braga *et al.* (2008), os testes realizados em *Candida albicans* para avaliar a interferência do timol na formação de biofilme, demonstraram que o principal mecanismo é a capacidade de alterar as estruturas 3D dos biofilmes conforme a concentração utilizada (34). E Romero *et al.* (2009) conferiram ao *Thymus vulgaris* (tomilho) seu efeito antifúngico devido à capacidade do timol e do carvacrol causar danos à membrana citoplasmática (35).

O óleo essencial do *Thymus vulgaris*, o tomilho, geralmente apresenta de 40 a 60% de timol, e também contém outro composto fenólico, o carvacrol, isômero do timol, o que então potencializa seus efeitos (36). Os estudos de Romero *et al.* (2009) e Almeida (2012) confirmam um efeito expressivo destes compostos contra fungos fitopatogênicos como o *Fusarium moniliforme*, *Corynespora cassicola* e *Colletotrichum musae*, e de leveduras como a *Candida albicans*, alterando somente as concentrações utilizadas para cada espécie (35, 36). Apresenta ainda efeito em bactérias como a *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus* (37). As propriedades do tomilho se devem à presença do timol e carvacrol que se ligam aos grupos aminas e hidroxilamina de proteínas que estão presentes nas membranas dos microrganismos, alterando assim sua permeabilidade e resultando em morte, além de degenerar as hifas no caso dos fungos (35).

O *Origanum vulgare*, conhecido como orégano, tem como constituintes mais expressivos os terpenos 4-terpineol, timol, carvacrol, gamaterpinemo, betacariofileno e metilcarvacrol, que juntos somam cerca de 80% do óleo essencial do *Origanum vulgare*, promovendo uma ação efetiva em virtude de induzirem alterações na membrana celular dos microrganismos. Podem atuar ainda se ligando a sítios ativos de enzimas microbianas, o que promoveria sua ação antimicrobiana (38). Desta forma, por apresentar teores destes terpenos com expressividade, o óleo essencial

de orégano tem propriedades fungicida e bactericida, porém, sua ação pode sofrer variações devido estes teores dependerem de fatores abióticos como clima e época do ano (39).

Assim, o timol é um antisséptico fenólico que tem atividades antibacteriana e antifúngica (31).

1.4 COPOLÍMERO ACRÍLICO: EUDRAGIT®

Eudragit® é uma marca comercial da empresa alemã Evonik Industries que se refere a uma classe de polímeros por ela comercializados. Eudragit® foi desenvolvido por Rohm & Haas GmbH em Darmstadt na década de 1950, com a finalidade de controlar o tempo ou o local de liberação das substâncias ativas dos medicamentos de uso oral, traçando a partir de então um novo capítulo na história da indústria farmacêutica (40, 41).

Eudragit® é preparado a partir da polimerização de acrílico e ácido metacrílico ou seus ésteres, como o éster butílico ou éster dimetilaminoetílico (41), dando origem a vários copolímeros especiais com diferentes graus de solubilidade (40), classificados como aniônicos, catiônicos ou neutros (cf. Figura 3) (41).

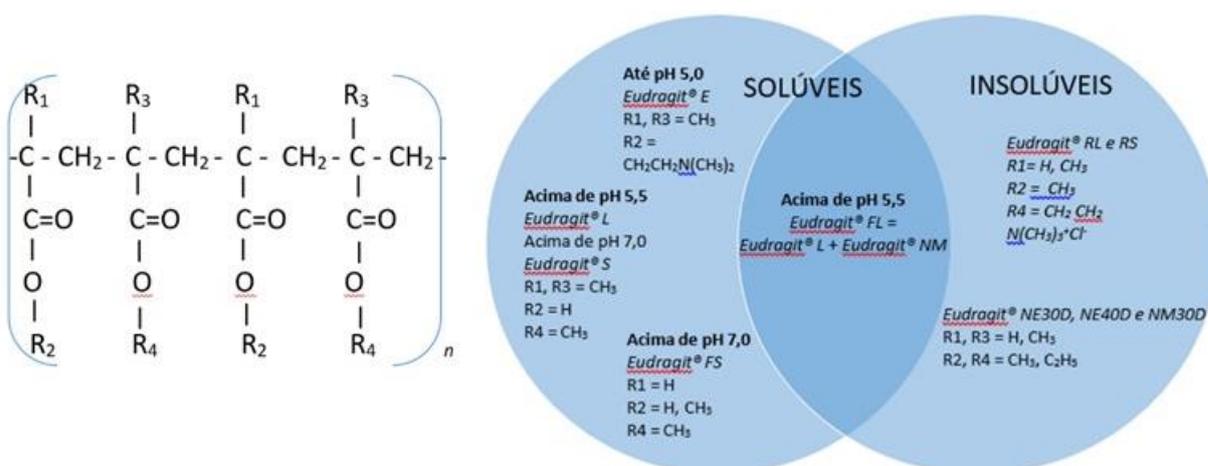


Figura 3 – Estrutura molecular dos copolímeros acrílicos Eudragit® (42, 43).

Os copolímeros EUDRAGIT® estão disponíveis nas formas de dispersões aquosas, soluções orgânicas, grânulos e pós, visando facilitar o manuseio e processamento, bem como maximizar os benefícios específicos de aplicação. Portanto, apresentam vantagens que permitem máxima flexibilidade para o

desenvolvimento de distintas formulações. Para as formas farmacêuticas sólidas apresentam funcionalidade confiável também em baixos níveis de revestimento, superfície de revestimento suave, revestimentos de múltiplas camadas, boa compressibilidade, alta capacidade de ligação de pigmentos, alto rendimento, alta estabilidade térmica, combinações poliméricas viáveis, excelente aderência, ampla versatilidade de formulação e magnífica definição do logotipo (44).

Esses copolímeros são amplamente utilizados como agentes de revestimento em formulações farmacêuticas orais, porém também usados em formulações tópicas, e geralmente são considerados não tóxicos e não irritantes, constando inclusive no banco de dados de ingredientes inativos da *Food and Drug Administration* (FDA) dos Estados Unidos, em medicamentos não parenterais licenciados no Reino Unido e na *Natural Health Products Ingredients Database* (NHPID) do Canadá (31).

Nas formulações de comprimidos e cápsulas orais, dependendo do tipo utilizado, podem-se produzir filmes de diferentes características de solubilidade, daí sua extensa utilização nesta forma farmacêutica (31, 41).

E em formulações de uso tópico podem ser empregados para uso local e em matrizes de sistemas de liberação transdérmica (31).

Podem também ser utilizados como aglutinantes tanto em processos orgânicos de granulação úmida como para controlar a liberação de um fármaco a partir de uma matriz sólida (31).

Para este trabalho, é importante salientar um copolímero específico, Eudragit® E, um copolímero catiônico à base de metacrilato de dimetilaminoetila, metacrilato de butila e metacrilato de metila, que se apresenta na forma de grânulos (Eudragit® E 100) incolores a amarelados ou na forma em pó (Eudragit® EPO), caracteristicamente solúvel em acetona e alcoóis (31, 45). É aplicado na forma de uma solução orgânica dissolvida em isopropanol, sendo seus filmes protetores ou de isolamento muito eficazes contra a umidade e o oxigênio, bem como amplamente recomendado para mascarar sabores e odores desagradáveis (43).

Eudragit® E é solúvel no fluido gástrico, bem como em soluções tampão fracamente ácidas (até pH 5), então usado como agente formador de filme simples ou isolante, aglutinante e diluente de comprimidos (31).

Como já mencionado, os copolímeros Eudragit® exibem aplicações diversas, tanto moduladora da liberação (entérica e sustentada), protetora, estabilizadora,

estética e organoléptica, inclusive abarcando outras vias de administração além da oral como, por exemplo a via tópica (46, 47), com alguns estudos descritos na literatura (48, 49, 50, 51, 52).

Tipre *et al.* (2002) desenvolveram um adesivo à base de Eudragit® E 100 com nitrendipina (potente molécula com propriedade hipotensiva) que permitisse a administração do fármaco a uma taxa máxima de entrada através da via transdérmica. O sistema de liberação transdérmica obtido resultou em filmes transparentes sem rugas com boa adesão à pele e a cinética de liberação observada foi devido à erosão do copolímero Eudragit® E 100 hidrofílico, e 100% de liberação foi observada em 20 minutos (48).

Frank (2014) desenvolveu nanopartículas de superfície catiônica com Eudragit® RS 100 que foram incorporadas a hidrogéis de quitosana para aplicação vaginal, as quais demonstraram viabilidade para a entrega de substâncias hidrofóbicas pela via vaginal (49).

Chaves (2017) elaborou nanocápsulas com Eudragit® RS 100, Eudragit® S 100 e poli- ϵ -caprolactona (PCL) visando verificar as propriedades mucoadesivas quando veiculadas em suspensão, hidrogel ou pós, e submetidas a diferentes superfícies mucoadesivas como discos de mucina, mucosa vaginal e mucosa bucal, a fim de posteriormente incorporar carvedilol e avaliar sua aplicabilidade em membrana sublingual. As nanocápsulas de Eudragit® RS 100 apresentaram melhor desempenho mucoadesivo, resultando um nanomedicamento para administração sublingual de carvedilol (50).

Patel *et al.* (2016) desenvolveram um esmalte medicamentoso com cloridrato de terbinafina utilizando Eudragit® RL 100 que apresentou um desempenho efetivo nos estudos *in vitro* e *ex vivo*, uma vez que a formulação selecionada após otimização estatística, permaneceu em contato com a lâmina ungueal por mais tempo e apresentou liberação do fármaco acima da concentração inibitória mínima, revelando sua eficácia. Concluíram que essa forma farmacêutica, em comparação com outras terapêuticas, pode ser usada como uma ferramenta promissora para o tratamento eficaz da onicomicose, podendo reduzir efeitos colaterais associados ao fármaco e propiciar uma melhor adesão do paciente (51).

El-sherif *et. al.* elaboraram formulações nanovesiculares com cloridrato de terbinafina nas formas farmacêuticas de gel tópico e esmalte para tratamento da onicomicose via transungueal. Para a preparação das formulações de gel usaram

Pluronic® em diferentes concentrações e método a frio, avaliando a temperatura de transição sol-gel, viscosidade e estudos de liberação *in vitro*. As formulações de esmalte foram preparadas com Eudragit® RLPO em diferentes concentrações e avaliadas quanto ao tempo de secagem, conteúdo não volátil, resistência à água e estudos de liberação *in vitro*. Na sequência realizaram estudo de permeação *ex vivo* com as formulações otimizadas para avaliar a permeação e retenção do fármaco nas unhas em comparação com o creme de cloridrato de terbinafina disponível comercialmente (creme Lamisil® 1%), e comprovaram que tanto as formulações de gel como de esmalte otimizadas foram bem sucedidas (52).

No entanto, não há nenhuma formulação de esmalte contendo Eudragit® sendo comercializada no Brasil.

1.5 ESMALTES UNGUEAIS

Os esmaltes para unhas há muito tempo têm sido usados como cosméticos para protegê-las e com fins decorativos. Normalmente, o esmalte se constitui de solventes, polímeros formadores de filme, resinas que aumentam a adesão do filme à placa ungueal, plastificantes que promovem flexibilidade e durabilidade do filme e corantes (53).

A formulação de esmalte medicamentoso para unhas é uma escolha usual para o tratamento antifúngico tópico, assim, além dos componentes mencionados anteriormente, também apresenta um fármaco antifúngico na sua constituição (54). O esmalte quando aplicado forma um filme fino (película), comumente insolúvel em água, contendo um medicamento antifúngico que é liberado lentamente conforme o gradiente de concentração (53). Os esmaltes medicamentosos são amplamente aceitos pelos pacientes por serem facilmente utilizados, bem como previnem a perda de água transungueal, permitindo a difusão sustentada do fármaco pelo gradiente de concentração (52).

Nos tratamentos tópicos usuais para onicomicoses são frequentes os fármacos na forma farmacêutica de esmalte. Como exemplo tem-se o esmalte a base de ciclopirox olamina a 8% que é aplicado nas unhas acometidas por fungos uma vez ao dia durante 48 semanas, apresentando eficácia menor que 50% em infecções nas unhas das mãos e 25% nas unhas dos pés, índices referentes a infecções que correspondem ao limite de 30% no comprometimento da superfície

ungueal. A amorolfina a 5% é outro fármaco disponível na forma farmacêutica de esmalte que promove uma taxa de cura de 40% para as unhas dos pés e 60% para as unhas das mãos. A adesão do paciente e os cuidados necessários de higiene são imprescindíveis para o sucesso e cura da onicomicose (55).

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Desenvolver esmalte antifúngico à base de copolímero acrílico Eudragit® E e timol.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar compatibilidade e interação dos insumos constituintes da fórmula por meio de estudos térmicos e espectroscópicos;
- Desenvolver as formulações dos esmaltes a partir de um desenho de mistura;
- Avaliar as qualidades físico-químicas e microbiológicas das formulações dos esmaltes;
- Selecionar a formulação de esmalte que obtiver os melhores resultados físico-químicos e microbiológicos.

3 MÉTODOS

3.1 MATERIAIS

Eudragit® E 100 (lote B130401503) cedido por Evonik (Brasil), timol (lote S2BF0370V) obtido da Sigma-Aldrich Brasil, ácido cítrico (lote MKBS3025V) também obtido da Sigma-Aldrich Brasil, 2-hidroxipropil-beta-ciclodextrina (lote BCBQ9423V) obtido da Aldrich, glicerina (lote 58591) obtida da empresa Dinâmica Química Contemporânea Ltda (Diadema-SP), álcool etílico absoluto P.A. 99,5% também obtido da Dinâmica Química Contemporânea Ltda (lote 85643) e água ultrapurificada (obtida em aparelho *Milli-Q*). Os insumos previamente descritos também são apresentados no quadro 1, juntamente às suas funções na fórmula do esmalte, função farmacotécnica e funções na via de administração:

Quadro 1 - Composição do esmalte e função de seus insumos

Componente	Função na fórmula	Função no organismo	Referências
Timol	Princípio ativo	Antifúngico	(31)
Eudragit® E 100	Copolímero acrílico base do esmalte e formador de filme	Matriz do fármaco que permite controlar sua liberação, como também oferece maior estabilidade à película durante sua permanência na unha.	(31, 43, 45)
2-hidroxipropil-beta-ciclodextrina	Agente solubilizante, conservante químico e microbiológico	Mantém as características do fármaco e conseqüentemente sua ação farmacológica.	(31)
Ácido cítrico	Agente solubilizante e plastificante	Permite a formação de uma película com estética agradável. Em adição, contribui para a eficiência da matrix ao formar uma película uniforme sobre a unha.	(56).
Glicerina	Agente solubilizante, umectante e emoliente	Mantém a umectação da unha, permitindo melhor efeito estético.	(31)
Solução hidroalcoólica	Veículo e conservante microbiológico.	Permite rápida secagem da película após aplicação do esmalte sobre a unha. Apresenta menor toxicidade aguda (4070mg/kg via cutânea em ratos) em comparação a outros solventes comumente usados em esmaltes para unhas, como: tolueno, formaldeído ou formol e álcool isopropílico (800mg/kg, 420mg/kg e 933mg/kg, através da via cutânea de ratos, respectivamente).	(31, 57)

3.2 CARACTERIZAÇÃO E COMPATIBILIDADE DOS INSUMOS

Misturas físicas dos insumos constituintes do esmalte e as respectivas formulações (cf. Quadro 2), na forma de filme, foram submetidas à análise térmica e espectrométrica para determinação de compatibilidade e de interação, de acordo com as metodologias descritas à continuação.

As misturas físicas (cf. Figura 4) foram obtidas fazendo a pesagem dos insumos e homogeneizadas manualmente e acondicionadas em microtubos tipo eppendorf. Os filmes foram obtidos a partir da pincelagem de cada formulação em lâmina de microscopia e à medida que secavam, eram removidos e acondicionados em microtubos tipo eppendorf.

3.2.1 Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC)

Ensaio realizado para obtenção das curvas de calorimetria exploratória diferencial (DSC) em equipamento Shimadzu – Série DSC 60 Plus, com as seguintes condições: aproximadamente 3 - 4mg de amostra, em atmosfera de Nitrogênio com fluxo de 50 mL/min, a 5°C/min, no intervalo de temperatura de 0 a 500°C em cápsulas tapadas.

3.2.2 Espectroscopia no Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR)

A análise de infravermelho foi realizada em um equipamento Varian 640-IR FTIR spectrometer (Varian Inc., Brasil). Os espectros foram obtidos nos comprimentos de onda entre 650 cm^{-1} e 4.000 cm^{-1} , utilizando o acessório de imagem ATR.

3.3 ELABORAÇÃO DAS FORMULAÇÕES: ESMALTES E MISTURAS FÍSICAS

Foi realizado um desenho de mistura para a elaboração das sete misturas físicas, de acordo com o esquema ilustrado na figura 4.

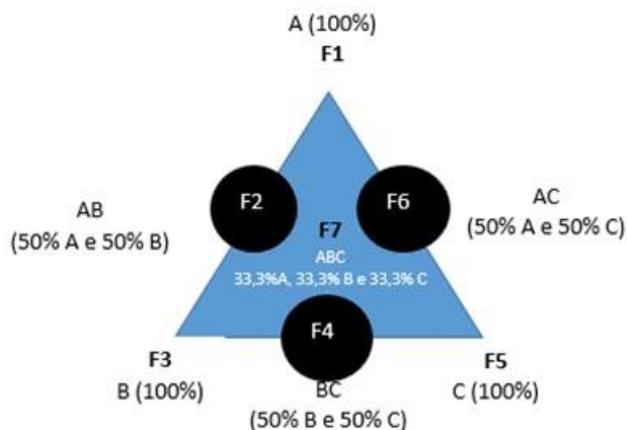


Figura 4 - Desenho de mistura para desenvolvimento de esmalte de Eudragit® E e timol.

As formulações dos esmaltes foram elaboradas a partir do desenho de mistura (*cf.* Quadro 2) e desenvolvidas no Laboratório de Tecnologia de Medicamentos, Alimentos e Cosméticos (LTMAC) da Universidade de Brasília (UnB).

Os componentes sólidos foram pesados e dissolvidos na solução hidroalcoólica sob agitação (agitador magnético Ika), em temperatura ambiente durante 1 hora, e em seguida, o produto obtido foi acondicionado em frasco de vidro para esmalte (10mL), de tampa rosqueável contendo pincel aplicador.

Quadro 2 - Composição em % (P/V) dos esmaltes à base de Eudragit® e timol a partir de desenho de mistura

COMPONENTES	FORMULAÇÃO % (P/V)						
	F1	F2	F3	F4	F5	F6	F7
Timol (SIGMA-ALDRICH)	3	3	3	3	3	3	3
Eudragit® E 100 (EVONIK)	10	10	10	10	10	10	10
A - 2-hidroxiopropil – beta-ciclodextrina (ALDRICH)	3	0	0	1,5	0	1,5	0,9
B - ácido cítrico (SIGMA-ALDRICH)	0	1	0	0,5	0,5	0	0,3
C – glicerina (DINAMICA)	0	0	1	0	0,5	0,5	0,3
Solução hidroalcoólica a 90% (DINAMICA)	q.s.p	q.s.p	q.s.p	q.s.p	q.s.p	q.s.p	q.s.p

3.4 CARACTERIZAÇÃO DAS FORMULAÇÕES DE ESMALTES À BASE DE TIMOL E EUDRAGIT® E

A caracterização das formulações elaboradas foi realizada a partir dos ensaios adiante descritos.

3.4.1 Características Estéticas da Solução

As formulações obtidas foram caracterizadas quanto à forma e à coloração, como: solução líquida em que nenhuma partícula é visível ao olho nu, ou dispersão líquida em que se tem uma suspensão; coloração clara (transparente ou amarelada) ou coloração opalescente (azulada ou cintilante) (58).

3.4.2 Determinação do pH da Solução

A aferição do pH de cada formulação foi feita com o uso de tira universal para medir pH da marca Kasvi (58).

3.4.3 Características Estéticas do Filme Após Secagem

Os filmes (ou películas) foram obtidos através da pincelagem de cada formulação em superfície de plástico grosso, e após secagem foram caracterizados quanto à cor, brilho e textura, respectivamente como: clara ou opalescente, brilhoso ou opaco e pegajoso ou não pegajoso (58).

3.4.4 Tempo de Secagem

O tempo de secagem dos filmes foi determinado fazendo-se a pincelagem de finíssima camada de cada formulação em lâmina de microscopia, em triplicata, e em ambiente controlado de temperatura a 25°C e 50% de umidade relativa do ar (U.R), em dessecador de vidro dotado de solução saturada de nitrato de magnésio (59). Imediatamente à aplicação, cronometrava-se o tempo necessário para formar um filme seco ao toque e o registrava.

3.4.5 Microscopia Óptica

As imagens microscópicas foram obtidas a partir dos filmes (ou películas) feitas em lâminas de microscopia e realizadas em microscópio biológico binocular com aumentos de 40x até 1600x da marca Opton (Brasil) (58).

3.4.6 Permeabilidade ou Resistência à Água

O ensaio de permeabilidade ou resistência à água avaliou o quanto os filmes são resistentes ou permeáveis à água (52). Foi realizado pesando placas de vidro vazias, em triplicata, em balança analítica e registrou-se os valores obtidos. Em seguida fez-se a pincelagem das formulações nas placas e aguardou secar até formarem o filme, e novamente pesou-se as placas, registrando os valores iniciais de filme. Em seguida, as placas foram submersas em água, utilizando-se banho-maria à 37°C durante 24 horas. Terminado este período, as placas foram retiradas do banho-maria, secou-se o excesso de água com papel toalha, e em seguida, fez-se nova pesagem das placas em balança analítica. Para avaliar a permeabilidade ou resistência dos filmes à água, utilizou-se as seguintes equações:

- (1)
$$\text{Massa da placa com filme esmalte} - \text{Massa da placa vazia} = \text{Massa inicial do filme de esmalte (Massa filme inicial)}$$
- (2)
$$\text{Massa da placa com filme de esmalte após submersão} - \text{Massa da placa vazia} = \text{Massa final do filme de esmalte (Massa filme final)}$$
- (3)
$$\text{Massa filme inicial} - \text{Massa filme final} = \text{Massa de água que permeou o filme}$$
- (4)
$$\text{Permeabilidade à água (\%)} = \frac{\text{Massa de água que permeou} \times 100}{\text{Massa inicial do filme}}$$

Os valores negativos indicam perda de massa após submersão. Indicando, portanto, o grau de resistência do filme ao contato com a água durante 24 horas.

3.4.7 Doseamento

Para o doseamento do timol nas formulações em solução, foi escolhido o método previamente validado em Cromatografia Líquida de Alta Eficiência com detector ultravioleta – CLAE-UV por Pires *et. al.* (2016) (60).

Cada formulação (16,6µL), em triplicata, foi submetida à diluição em 50mL de metanol. Em seguida foi retirado 1mL de cada diluição e submetido à filtração frontal

em membranas com porosidade de 0,22 μ m. As amostras obtidas (10 μ L de volume de injeção) foram analisadas por CLAE-UV (Shimadzu, modelo 20-AD, Kyoto, Japão), com detector UV conectado a equipamento dotado de Software LC-Solution. As análises foram realizadas utilizando-se fase estacionária uma coluna de fase reversa Luna C18 com dimensões de 300 x 3,9mm e tamanho de partículas 10 μ m (Phenomenex, EUA) e fase móvel composta pela mistura de água ultrapura obtida em equipamento Milli-Q e acetonitrila de grau HPLC da marca J.T.Baker (Philisburg, EUA) na proporção de 35:65 (v/v), empregando-se fluxo de 1,2mL/minuto, com 8 minutos de corrida, forno a 50°C e detecção a 278 nm.

3.4.8 Ensaio de Liberação em Células de Difusão

O ensaio de liberação foi realizado *in vitro* com duração de 24 horas, utilizando células de difusão do tipo Franz modificada e membrana sintética de acetato de celulose (Fisherbrand, Leicestershire, UK), a qual foi colocada entre os compartimentos doador e receptor da célula conforme figura 5.

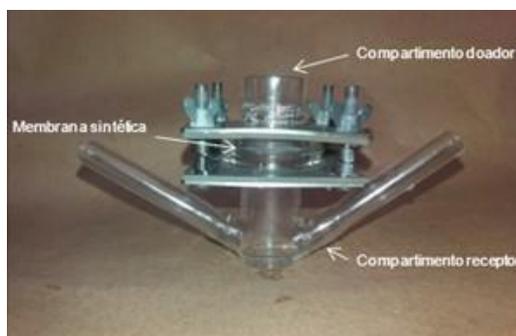


Figura 5 – Fotografia da célula de difusão do tipo Franz modificada.

Este ensaio compreendeu o estudo de todas as formulações e da solução controle que se tratava de uma solução hidroalcoólica a 90% contendo timol a 3%, em quintuplicata e em condições *sink*, na qual a concentração do fármaco não deve ultrapassar 10-15% da sua solubilidade máxima no meio selecionado (61).

Preparadas as células, estas tiveram seu compartimento receptor preenchido com solução tampão fosfato pH 7,4 e no compartimento doador foram aplicados 200 μ L da formulação em análise ou da solução controle uniformemente sobre a membrana sintética e deixou secar, sendo em seguida protegido de fatores externos

com auxílio de papel alumínio. As células foram colocadas em placa agitadora e permaneceram em banho termostatizado a 32°C durante todo o ensaio.

Foram retiradas alíquotas de 1mL do meio receptor de cada célula de difusão nos tempos 0, 15min, 30min, 1h, 2h, 3h, 4h, 5h, 6h, 12h e 24h, tendo ocorrido a reposição do meio logo após todas as retiradas realizadas.

As alíquotas coletadas foram submetidas à filtração frontal em membranas com porosidade de 0,22µm, sendo posteriormente analisadas em CLAE-UV.

3.4.9 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

A quantificação do timol tanto do doseamento como das amostras obtidas no ensaio de liberação foi realizada através do Cromatógrafo Líquido de Alta Eficiência (CLAE) com detector UV da marca Shimadzu modelo LC-20AD (Kyoto, Japão). Utilizou-se uma coluna de fase reversa Luna C18 com dimensões de 300 x 3,9mm e tamanho de partículas 10µm (Phenomenex, EUA) e fase móvel composta pela mistura de água ultrapura obtida em equipamento Milli-Q e acetonitrila de grau HPLC da marca J.T.Baker (Philisburg, EUA) na proporção de 35:65 (v/v) com fluxo de 1,2mL/minuto e 8 minutos por corrida. A detecção de UV foi realizada a 278 nm, a temperatura do forno foi de 50°C e o volume de injeção foi de 10µL (60).

3.5 ATIVIDADE MICROBIOLÓGICA

A atividade microbiológica pode ser avaliada por meio do ensaio conhecido como teste de difusão em poço, e para este estudo, foram elencados os microrganismos *Candida albicans* e *Trichophyton mentagrophytes* (cf. Figura 6).

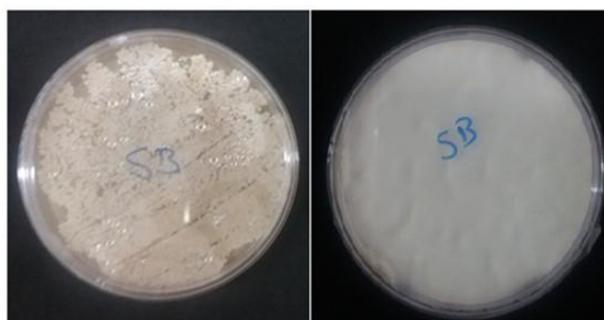


Figura 6 – Fotografia dos cultivos de *Candida albicans* (A) e *Trichophyton mentagrophytes* (B) em meio ágar Sabouraud-dextrose.

3.5.1 Teste de Difusão em Poço

Para a realização deste ensaio foram utilizadas cepas de *Candida albicans* (ATCC 90028) e *Trichophyton mentagrophytes* (ATCC 11481) fornecidas pelo Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde (INCQS), da Fundação Oswaldo Cruz-FIOCRUZ. O ensaio compreendeu a avaliação das sete formulações (F1, F2, F3, F4, F5, F6 e F7), da solução hidroalcoólica 90%, do timol a 3% em solução hidroalcoólica 90% e do copolímero Eudragit® E 100 a 10% em solução hidroalcoólica 90%.

As subculturas foram cultivadas em placas de ágar Sabouraud-dextrose mantidas em estufa incubadora Quimis (Brasil) a 35°C durante 24 horas para *Candida albicans*, e para *Trichophyton mentagrophytes*, em placas de ágar Sabouraud-dextrose suplementado com glicose 2% durante 7 dias em temperatura de 25°C. Os inóculos foram preparados em cabine de segurança biológica Esco Class II Airstream (Pensilvânia, EUA) (cf. Figura 7). Para o inóculo de *Candida albicans*, as colônias isoladas foram suspensas em 5mL de solução salina estéril a 0,85%, a concentração foi ajustada pela escala de McFarland 0,5 com uso de espectrofotômetro Biospectro SP-22 (Brasil), com comprimento de onda de 530nm, fornecendo assim uma suspensão-padrão de levedura contendo 1×10^6 a 5×10^6 células por mL (62).



Figura 7 – Fotografia da cabine de segurança biológica.

O inóculo do *Trichophyton mentagrophytes* foi preparado a partir das colônias recém cultivadas que ainda na placa foram suspensas em 5mL de solução salina estéril a 0,85% adicionada de 100µL de Tween 20, o que facilitou a remoção de conídios ou esporangiosporos e fragmentos de hifas, e em seguida foi transferida para um tubo de ensaio estéril que foi tampado firmemente, e depois a homogeneizou em agitador vórtex durante 15 segundos. Em seguida, foi lida e ajustada a densidade da suspensão em espectrofotômetro conforme solução-padrão da escala de McFarland 0,5 em comprimento de onda de 625nm, adicionando solução salina estéril a 0,85% e homogeneizando em agitador vórtex durante alguns segundos, até alcançar a absorvância que varia de 0,09 a 0,11 (transmitância de 80 a 82%) (63).

Todas as placas de Agar Sabouraud-dextrose enriquecido com 2% de glicose foram preparadas antecipadamente contendo 6mm de altura, sendo que as placas utilizadas para *Candida albicans* eram de 90mm e para *Trichophyton mentagrophytes* as de 150mm. Foram realizados semeios em superfície com o uso de um swab, estes foram distribuídos uniformemente sobre a superfície do Agar das respectivas suspensões de *Candida albicans* e *Trichophyton mentagrophytes*. Em cada placa para o teste com *Candida albicans* fez-se 1 poço de 6mm de diâmetro no meio da placa, sendo em triplicata, onde foram depositados 100µL das formulações e das soluções de controle, totalizando 30 placas. Nas placas para o teste com *Trichophyton mentagrophytes* também foi feito apenas um poço de 6mm de diâmetro onde foram depositados 200µL das formulações e das soluções de controle, tendo sido em duplicata totalizando 20 placas (cf. Figura 8).



Figura 8 - Fotografia da placa para o teste de difusão em poço.

As placas com *Candida albicans* foram incubadas em estufa a 36,5°C por 48 horas, e as com *Trichophyton mentagrophytes* foram colocadas em jarra de anaerobiose para incubação em temperatura de 25°C durante 7 dias. Passados estes períodos, mediu-se em milímetros o halo de inibição do crescimento apresentado em cada placa com paquímetro. Os valores aferidos foram registrados, calculou-se as médias aritméticas dos halos, bem como foram comparados aos apresentados pelas soluções de controle. As placas ainda puderam ser observadas com mais detalhes em equipamento transluminador UV onde foram fotografadas.

3.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise estatística foi realizada através do programa GraphPad Prism, no qual foram feitas as análises comparativas das formulações entre si e com os controles. Os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e teste de Tukey com comparações múltiplas, tendo como nível de significância estatística $P < 0,05$.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 CARACTERIZAÇÃO E COMPATIBILIDADE DOS INSUMOS

O desenvolvimento de uma formulação compreende o estudo das características físicas e químicas dos excipientes e do fármaco isoladamente e combinados entre si, compreendendo o processo chamado pré-formulação (64, 65). Dificilmente os fármacos ou insumos farmacêuticos ativos (IFA) são administrados sozinhos, e sim em combinação com vários componentes não medicinais chamados excipientes que têm função farmacêutica variada e especializada (65).

O estudo de pré-formulação tem como objetivo nortear a elaboração de uma forma farmacêutica eficaz, segura e de qualidade associada às boas práticas de fabricação, sendo assim imprescindível para que o pesquisador possa agregar as propriedades físico-químicas relacionadas ao fármaco, aos excipientes e à interação entre eles visando obter a melhor forma farmacêutica (64). A escolha das substâncias da nova formulação deve ser bem cautelosa a fim de conseguir melhores características estéticas, sensoriais, de estabilidade, eficácia e segurança, buscando principalmente a biodisponibilidade desejada (64, 66). Para tal fim, neste estudo foram realizados os ensaios de calorimetria exploratória diferencial (DSC) e espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier (FTIR), os quais permitem delinear a interação e compatibilidade entre fármaco e excipientes.

4.1.1 Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC)

A análise térmica das misturas físicas e das formulações resultou as curvas de DSC constantes da figura 9, onde se observou que ambas apresentaram essencialmente o mesmo resultado. O timol puro mostrou um pico endotérmico com temperatura de 50,3°C o que está em conformidade com seu ponto de fusão no intervalo de 48°C - 51°C (31), sendo que este pico não ocorreu nos demais perfis, seja nas misturas físicas ou nas formulações dos esmaltes, pois se apresentou em temperaturas mais elevadas, no intervalo entre 100°C e 200°C. Este fato vem indicar que os demais componentes das formulações estão contribuindo para proteger o fármaco, fazendo com que este se mantenha estável por mais tempo nas formulações. O mesmo ocorreu no estudo de Pires *et. al* (2017) onde os excipientes

lecitina de soja (LC) e polisorbato 80 (P80) promoveram um expressivo deslocamento para temperaturas mais altas do ponto de fusão do timol, tendo este aumentado em mais de 20°C (67). Estudos feitos por Cevallos *et. al.* (2010), Lima *et. al.* (2012) e Nieddu *et. al.* (2014) também detectaram este evento em curvas de DSC do timol puro e em complexos de inclusão com beta-ciclodextrinas, corroborando na justificativa que o excipiente 2-hidroxipropil-beta-ciclodextrina contribui para a proteção do fármaco, embora não esteja presente em todas as formulações (68, 69, 70).

Observou-se ainda que nas composições que continham o excipiente ácido cítrico que tem ponto de fusão em 100°C, também o apresentou em temperaturas um pouco mais elevadas, sendo que tanto nas misturas físicas como nos esmaltes foi no intervalo de 120°C – 160°C.

Quanto ao excipiente glicerina que compunha as formulações de esmalte F3, F5, F6 e F7, por apresentar ponto de fusão em 17,8°C, não foi possível identificar nas curvas DSC de misturas físicas e nem dos esmaltes.

O copolímero Eudragit® E 100 em virtude de suas próprias características, catiônico, solúvel em alcoóis e agente formador de filme (31), apresentou-se compatível com os demais excipientes, não demonstrou interagir e nem interferir, uma vez que nas curvas de DSC os picos do fármaco estão presentes, ainda que deslocados, evidenciando sua contribuição para a proteção e estabilidade.

Vale destacar que com as análises em DSC foi possível inferir que não houve interação entre os excipientes e o fármaco que comprometesse a estabilidade da formulação, podendo dizer que a formulação de esmalte F7 por conter todos os excipientes e o solvente, apresentou estabilidade uma vez que o fármaco estava sendo protegido pelos excipientes presentes.

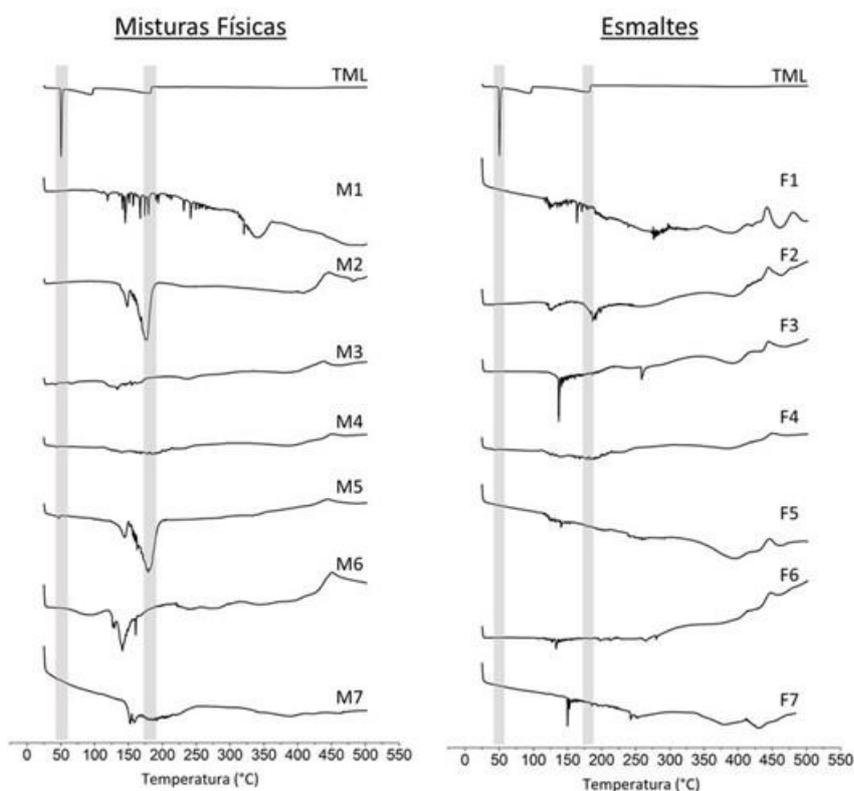


Figura 9 – Curvas de DSC do timol puro, das misturas físicas (M1 a M7) e das formulações dos esmaltes (F1 a F7).

4.1.2 Espectroscopia no Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR)

Comprovada a estabilidade térmica da formulação F7, foi realizada nesta uma análise adicional de espectroscopia de infravermelho. Nesta análise, o espectro da formulação foi comparado com o espectro da mistura física dos materiais que a compõe sem qualquer processamento e sem a presença do solvente.

Como mostrado na figura 10 quando comparados, os picos da mistura física 7 com os da formulação de esmalte F7, foi observado que os picos se mantêm nos mesmos comprimentos de onda, como por exemplo, os picos nos comprimentos de onda 3325cm^{-1} , pico correspondente à hidroxila (OH), 2954cm^{-1} , pico correspondente à ligação $\text{Csp}^3\text{-H}$ e 1720cm^{-1} correspondente à ligação C=O , sendo que todas estas estruturas estão presentes em todas as moléculas que compõe a formulação. Uma exceção foi encontrada no pico que ocorre na mistura física no comprimento de onda 1028cm^{-1} correspondente à ligação C-O . Este pico ocorre na formulação no comprimento de onda 1147cm^{-1} e isso pode indicar uma interação, provavelmente uma ligação de hidrogênio entre alguns componentes durante o

processamento da formulação. Porém, a princípio, esta interação não compromete a estabilidade da formulação visto que as estruturas se mantiveram sofrendo apenas desvios (71).

Isso corrobora com os dados da análise térmica mostrando que a estabilidade também foi mantida a nível molecular.

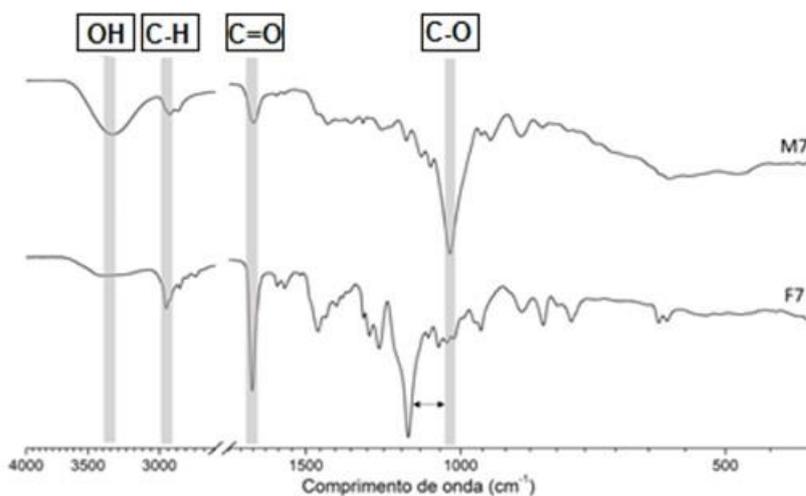


Figura 10 – Espectros em infravermelho da mistura física M7 e da formulação de esmalte F7.

4.2 CARACTERIZAÇÃO DAS FORMULAÇÕES DE ESMALTES À BASE DE TIMOL E EUDRAGIT® E

As sete formulações obtidas (*cf.* Figura 11) apresentaram as características descritas no quadro 3 logo em seguida.



Figura 11 – Fotografia dos esmaltes antifúngicos contendo timol.

Quadro 3 – Caracterização das formulações

FORMULAÇÃO	SOLUÇÃO			FILME		
	Forma	Coloração	pH	Coloração	Brilho	Textura
F1	Líquida	Clara	6,5	Clara	Brilhoso	Não pegajoso
F2	Líquida	Clara	6	Clara	Brilhoso	Não pegajoso
F3	Líquida	Clara	6,5	Clara	Brilhoso	Não pegajoso
F4	Líquida	Clara	6	Clara	Brilhoso	Não pegajoso
F5	Líquida	Clara	6	Clara	Brilhoso	Não pegajoso
F6	Líquida	Clara	6,5	Clara	Brilhoso	Não pegajoso
F7	Líquida	Clara	6,5	Clara	Brilhoso	Não pegajoso

4.2.1 Características Estéticas da Solução

Todas as formulações, quanto à forma e coloração, apresentaram a solução líquida e a coloração clara respectivamente (*cf.* Figura 11). Caracteres adequados ao produto desejado.

4.2.2 Determinação do pH da Solução

A depender da forma farmacêutica da formulação desenvolvida, bem como de acordo com sua função, o seu pH deve ser de valor aproximado ao do pH de máxima estabilidade do fármaco presente e da área de administração. Em se tratando de esmalte, o pH deve ser aproximado ao da unha que apresenta uma faixa de pH levemente ácido entre 4,6 e 5,8 o que contribui para a proteção bactericida e fungicida em sua superfície (72, 73, 74).

Na determinação do pH, para as formulações F2, F4 e F5 verificou-se pH=6 e para as demais pH=6,5 (*cf.* Quadro 3), valores estes relativamente próximos ao da unha, entretanto ficariam melhores através do ajuste de pH das formulações.

O pH do timol varia de 5 a 7 a depender do solvente a solubilizá-lo, e conforme estudos de Shah *et. al.* (2012) e Zhang *et. al.* (2014), o timol quando nanodisperso ou nanoparticulado apresentou melhor estabilidade associada ao valor do pH da dispersão ou partícula obtida, e em ambos valores de pH neutro (75, 76).

4.2.3 Características Estéticas do Filme Após Secagem

Todos os filmes obtidos das formulações após secagem apresentaram coloração clara, brilho e textura não pegajosa (*cf.* Quadro 3), corroborando para que esta forma farmacêutica tenha futuramente boa aceitação por parte daqueles que necessitarão fazer uso.

4.2.4 Tempo de Secagem

O tempo de secagem é um parâmetro de grande importância para a avaliação de esmalte medicamentoso (77, 78, 79). Se o tempo de secagem é prolongado resulta uma aplicação desigual, entremeada e descorada, ao passo que o tempo de secagem rápido pode levar ao endurecimento do esmalte no pincel de aplicação e/ou reduzir o tempo de permanência no pincel dificultando a aplicação e ocasionando a má formação do filme na unha (52). Um esmalte ideal para unhas deve ter as atribuições de secagem rápida, a formação de um filme liso na lâmina ungueal (79) e um tempo de secagem satisfatório de 1 a 2 minutos (77, 80, 81).

Os tempos de secagem das formulações desenvolvidas ficaram no intervalo de $54,97s \pm 0,32s$ a $80,39s \pm 0,77s$, sendo que o tempo de secagem mínimo registrado foi da F1 e o máximo da F4. A variação no tempo de secagem das formulações refere-se às concentrações diferenciadas dos excipientes em cada uma delas, tendo em vista que as concentrações do Eudragit® E 100 e do timol são iguais em todas as formulações.

As médias dos tempos de secagem obtidas apresentaram diferenças estatisticamente significativas exceto entre as médias de F2 e F4 (*cf.* Gráfico 1). Pode-se afirmar então que os tempos de secagem das formulações estão dentro do intervalo satisfatório.

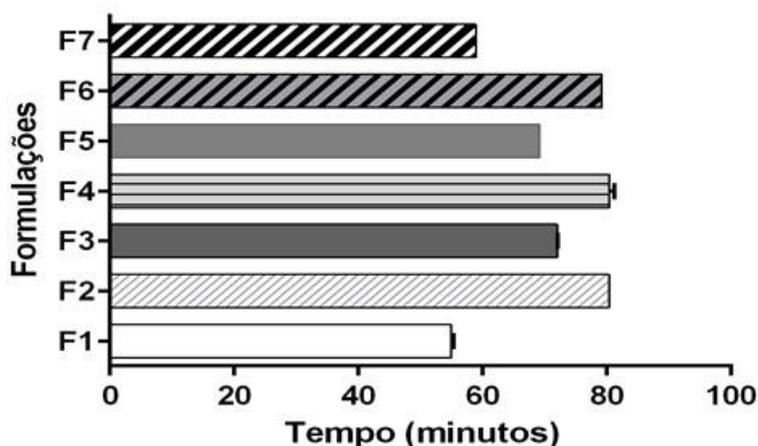


Gráfico 1 – Tempo de secagem dos esmaltes de Eudragit® E contendo timol obtidos no desenho de mistura.

4.2.5 Microscopia Óptica

A microscopia óptica é uma técnica que permite a observação de uma amostra, que é impossível ser vista a olho nu, com a incidência de luz visível e de lentes objetivas que proporcionam um aumento de até 1000x através de um microscópio (82, 83, 84). Para tal fim, torna-se necessário o preparo da amostra de forma adequada, então precisa ser depositada em lâmina e suficientemente fina para que possibilite a passagem dos raios luminosos (84).

Foram realizadas as imagens de todas as formulações, da base elaborada somente com Eudragit® E 100 em solução hidroalcoólica a 90% e de uma base comercial (*cf.* Figura 12), sendo que excetuando a formulação F1 e as bases que foram possíveis a visualização no aumento de 100x, todas as demais foram com o aumento de 40x, pois à medida que se empenhava em buscar definição das imagens em aumentos maiores não havia possibilidade de precisão quanto ao foco.

Como já mencionado anteriormente, é desejável que o filme do esmalte na lâmina ungueal seja liso e homogêneo, portanto, em observando e comparando as imagens das formulações entre si e com as imagens das bases, percebe-se rugosidades nas formulações F1, F2 e F4, justamente as que não possuem a glicerina como excipiente, que é o agente umectante e emoliente. As demais apresentaram filmes mais lisos e próximos em semelhança com os obtidos das bases, destacando-se inclusive os das formulações F6 e F7.

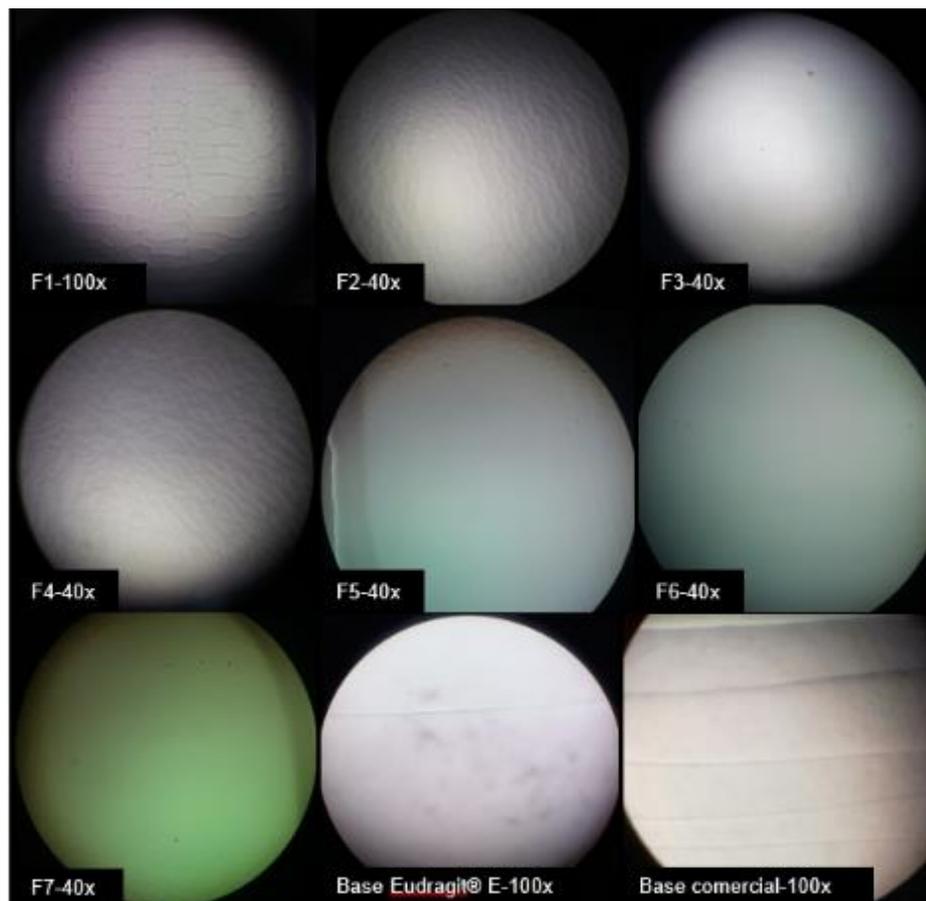


Figura 12 – Fotografias das imagens microscópicas dos filmes das formulações desenvolvidas, da base de Eudragit® E 100 e de base comercial.

4.2.6 Permeabilidade ou Resistência à Água

O ensaio de permeabilidade à água consiste em determinar a quantidade de água absorvida pelo filme formado na placa de vidro (52, 77, 78, 85), enquanto a resistência à água refere-se à avaliação da perda de massa por erosão ou solubilização do filme (52).

O copolímero Eudragit® E 100, componente base em todas as formulações, quando em meio com $\text{pH} > 5$, intumescce e torna-se permeável (86), o que neste ensaio poderia ter contribuído para a permeabilidade dos filmes, uma vez que os valores de pH das formulações foram maiores do que o pH que o copolímero exige.

O ensaio de resistência à água demonstrou a ação solubilizante dos componentes 2-hidroxipropil-beta-ciclodextrina, ácido cítrico e glicerina. A formulação que tem menor resistência à água é a F1 com perda de massa de $39,00 \pm 7,92\%$ (Gráfico 2), a qual tem como excipiente a 2-hidroxipropil-beta-ciclodextrina

que tem grande solubilidade em água, e a de maior resistência à água, com menor perda de massa, foi a F3 com $18,13 \pm 3,93\%$ que contém glicerina (31).

Os resultados demonstraram que a 2-hidroxipropil-beta-ciclodextrina e o ácido cítrico, nas proporções usadas nas formulações, têm ação semelhante conferindo menor resistência à água, enquanto a glicerina conferiu maior resistência. Essa constatação também está presente nas formulações F4, F5 e F6, em que a 2-hidroxipropil-beta-ciclodextrina e/ou ácido cítrico estavam presentes e não apresentaram diferença entre si (*cf.* Tabela 2).

Embora as formulações tenham apresentado perda de massa, as porcentagens não inviabilizam o tratamento uma vez que esmalte medicamentoso é de uso diário.

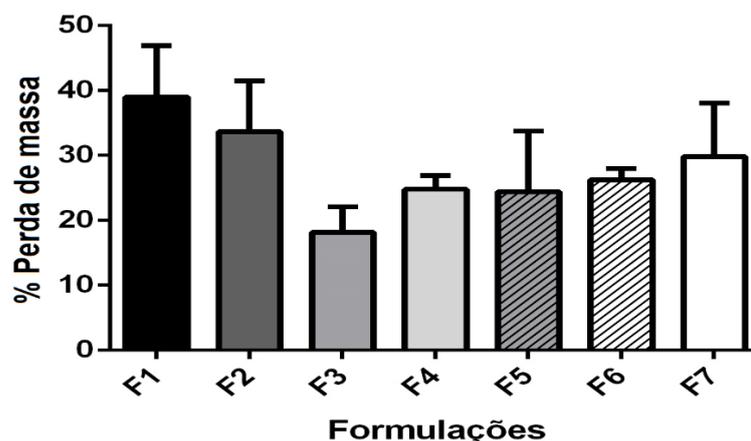


Gráfico 2 – Perda de massa (%) das formulações observada no ensaio de resistência à água. As barras representam as médias da porcentagem de perda de massa das formulações e as barras de erro, os desvios-padrão.

Tabela 2 – Análise estatística da resistência à água

Formulação	Valores de P						
	F1	F2	F3	F4	F5	F6	F7
F1	-	NS	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001	0,0003	0,0184
F2	NS	-	< 0,0001	0,0259	0,0164	NS	NS
F3	< 0,0001	< 0,0001	-	NS	NS	NS	0,0011
F4	< 0,0001	0,0259	NS	-	NS	NS	NS
F5	< 0,0001	0,0164	NS	NS	-	NS	NS
F6	0,0003	NS	NS	NS	NS	-	NS
F7	0,0184	NS	0,0011	NS	NS	NS	-

(Two-way ANOVA) – Comparações múltiplas (Teste de Tukey); NS: Não significativa.

4.2.7 Doseamento

O doseamento refere-se à quantidade de fármaco constante da formulação, neste estudo, esmalte medicamentoso para unhas.

Para quantificar com precisão o fármaco das formulações foi feita a curva analítica de timol em metanol com 10 pontos e através de soluções metanólicas contendo o fármaco nas concentrações 0,5; 1,0; 2,5; 5,0; 7,5; 10,0; 12,5; 15,0; 20,0 e 30,0 µg/mL em quintuplicata, que após leitura em CLAE-UV (60), os dados obtidos resultaram a equação da reta de regressão $y = 6410,6x + 1372,3$ e o coeficiente de correlação linear (r^2) 0,998 (cf. Gráfico 3), que apresentou adequação comparado ao mínimo aceitável para este fim ($r^2 = 0,990$) (87).

Assim sendo, realizada a quantificação do timol em CLAE-UV para todas as formulações, foram obtidos os valores correspondentes de cada formulação (cf. Tabela 3), os quais mostraram que todas elas contêm quantidade uniforme do fármaco.

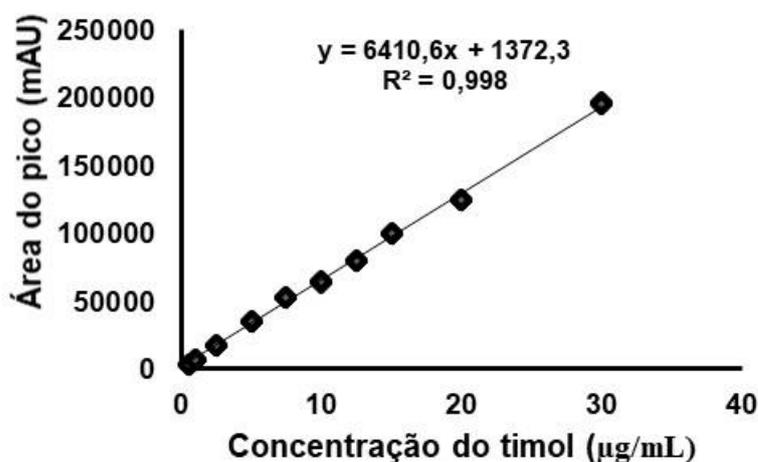


Gráfico 3 – Representação gráfica da curva analítica obtida em CLAE-UV para soluções metanólicas de timol.

Tabela 3 – Doseamento do timol nas formulações

Formulação	Timol (µg/mL)	Desvio Padrão	%
F1	9,93	0,61	99,33
F2	9,79	0,31	97,94
F3	9,60	0,08	96,01
F4	9,76	1,69	97,57
F5	9,95	0,39	99,45
F6	9,59	0,43	95,90
F7	9,87	0,17	98,66

4.2.8 Liberação em Células de Difusão

A cinética de liberação do esmalte medicamentoso à base de Eudragit® E 100 e timol foi avaliada *in vitro* utilizando células de difusão do tipo Franz modificada e membrana sintética de acetato de celulose para todas as formulações e uma solução controle contendo o fármaco.

Para quantificar a concentração liberada de timol das amostras coletadas do meio receptor durante o período de 24 horas, também foi feita a curva analítica do fármaco em solução tampão fosfato pH 7,4 com 10 pontos e utilizando soluções tamponadas contendo timol nas concentrações 0,5; 1,0; 2,5; 5,0; 7,5; 10,0; 12,5; 15,0; 20,0 e 30,0 µg/mL em quintuplicata. As amostras foram submetidas à análise em CLAE-UV (60) e os dados resultantes forneceram a equação da reta de regressão $y = 4445,6x + 2191,7$ e o coeficiente de correlação linear (r^2) 0,994 (cf. Gráfico 4), que também estava conforme o mínimo aceitável de 0,990 (87).

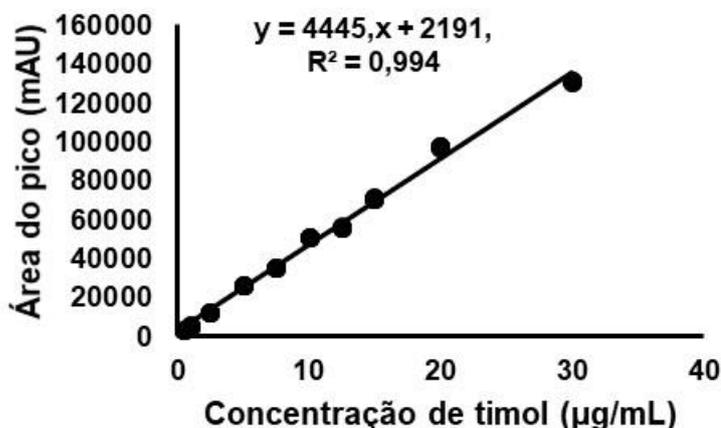


Gráfico 4 - Representação gráfica da curva analítica obtida em CLAE-UV para soluções tampão fosfato pH 7,4 com timol.

Os resultados obtidos em CLAE-UV foram analisados estatisticamente em relação à porcentagem final de cada formulação (cf. Tabela 4).

Assim, constatou-se que a F4 foi a formulação que apresentou a menor porcentagem de liberação do fármaco em meio receptor $15,31 \pm 1,15\%$, e a que apresentou maior porcentagem de liberação do fármaco foi a F7 com $41,89 \pm 4,84\%$, e neste intervalo as demais apresentaram suas porcentagens de liberação do timol em meio receptor. Em outros estudos como os de El-Sherif *et. al.* (2018) e Joshi *et. al.* (2015), a quantidade de fármaco liberado foi diminuindo à medida que aumentava a concentração do polímero que utilizaram, e nesses casos eram os copolímeros Eudragit® RLPO e Eudragit® RS 100 respectivamente (52, 77). No presente estudo a concentração de Eudragit® E 100 nas formulações permaneceu inalterada, sendo assim, a variação ocorrida na liberação pode ser justificada pela interação fármaco-copolímero com os demais excipientes da formulação (88).

Tabela 4 – Resultados das médias finais de liberação do timol das formulações e do controle em 24h

Formulação	Média Liberação %	Desvio padrão (%)
F1	21,66	0,38
F2	19,08	0,76
F3	18,53	1,90
F4	15,31	1,15
F5	16,76	1,13
F6	39,25	3,21
F7	41,89	4,84
Controle	83,37	5,94

O gráfico 5 apresenta os perfis de liberação obtidos das formulações de esmalte e da solução controle contendo timol, observou-se que o controle teve a porcentagem de liberação de $83,37 \pm 5,94\%$, bastante superior às das formulações em estudo. Além da falta de interação com o copolímero, o timol quando solubilizado em etanol apresenta pH neutro (31), próximo ao pH do meio receptor (pH 7,4), proporcionando a liberação do fármaco de forma bem mais expressiva na amostra controle.

A amostra controle em relação às formulações e estas entre si não apresentaram diferença estatística significativa entre os tempos 0 e 2ª hora. No intervalo da 3ªh até à 5ªh, somente a solução controle apresentou diferença estatística significativa em relação às formulações, pois com F4 e F5 na 3ªh, sendo

os valores de $P < 0,05$, na 4ªh em relação às formulações F2 a F7 com valores de P variando de 0,0038 a 0,0001 e na 5ª h em relação a todas as formulações com $P < 0,0001$. Já a partir da 6ªh até o final, tanto a solução controle como algumas formulações entre si apresentaram diferenças estatísticas significativas, que foram: a solução controle em relação a todas as formulações com valor de $P < 0,0001$; as formulações F2, F3, F4 e F5 em relação às formulações F6 e F7 com valores de $P < 0,01$ na 6ªh e $P < 0,0001$ nas 12ªh e 24ªh.

A formulação F1 apresentou diferença estatística significativa em relação às formulações F6 e F7 nos dois últimos tempos com valores de $P < 0,05$ e $P < 0,0001$ respectivamente. Estas diferenças estatísticas significativas confirmaram que as formulações F6 e F7 tiveram maior quantidade de timol liberado, e portanto, porcentagens de liberação maiores que as demais, sendo que entre elas não há diferença estatística. A presença de 2-hidroxiopropil-beta-ciclodextrina (F1, F6 e F7) (cf. Gráfico 6), como esperado, incrementa a liberação de timol, devido ao aumento de sua solubilidade. Entretanto, a combinação da ciclodextrina com agente umectante glicerina (F5), potencializam esse efeito de solubilização do timol. Enquanto que a combinação da ciclodextrina com o plastificante ácido cítrico (F4) apresentam menor influência na liberação (cf. Gráfico 6).

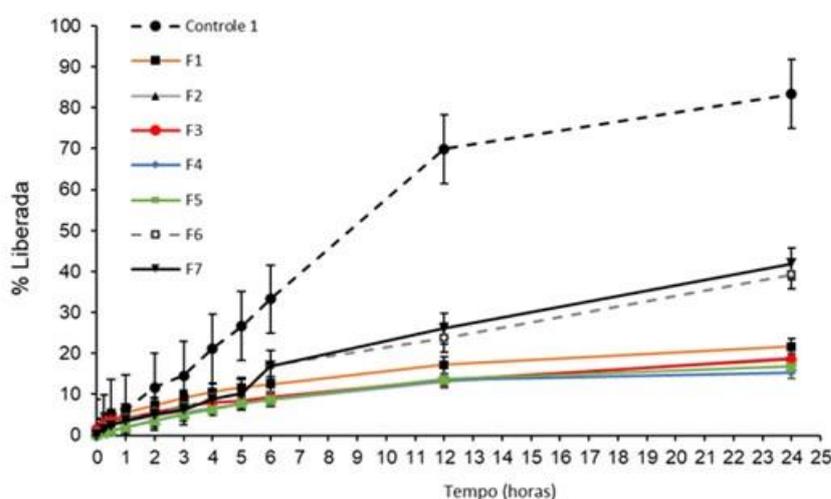
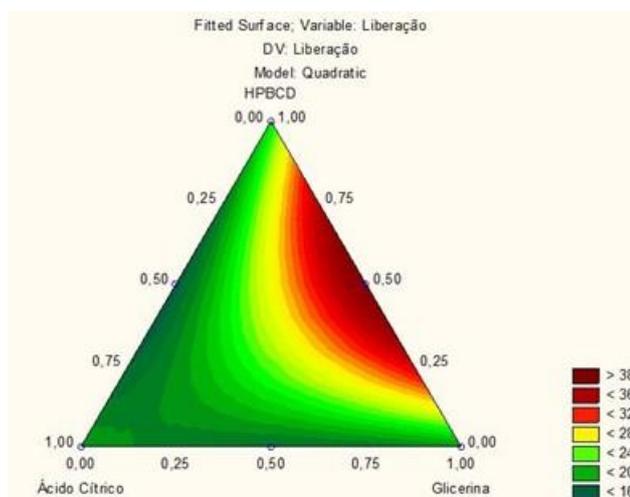


Gráfico 5 – Perfis de liberação in vitro das formulações de esmalte e da solução controle contendo timol. Os pontos centrais representam as médias da % liberada das replicatas, e as barras de erro representam o desvio padrão.



$$V = 19,085x + 18,5275y + 21,6575z - 8,195xy - 20,265xz + 76,61yz \quad R^2 = 1$$

Gráfico 6 – Gráfico de contorno obtido para variável liberação do desenho de mistura com os agentes solubilizantes do esmalte antifúngico de Eudragit® E contendo timol: ácido cítrico (x), glicerina (y) e HPBCD (z).

Para a determinação do modelo cinético de liberação in vitro das diferentes formulações de esmalte foi utilizado o software DDSolver. O tratamento matemático das curvas de dissolução demonstrou que as formulações possuem cinéticas de liberação controlada (Tabela 5). O ajustamento ao modelo de Korsmeyer-Peppas é utilizado de forma genérica para analisar a liberação de fármacos a partir de formas farmacêuticas poliméricas, quando o mecanismo de liberação não foi bem caracterizado ou quando possam estar envolvidos mais de um tipo de mecanismo de liberação, aparentemente independentes. O modelo de Higuchi se adapta melhor a sistemas de liberação prolongada. O modelo de Hixson-Crowell indica uma liberação dependente da raiz cúbica do tempo. Na liberação ajustada a cinética de primeira ordem, a quantidade liberada de fármaco em função do tempo é dependente de sua quantidade remanescente na formulação. Por fim, no perfil cinético de ordem zero, a liberação é independente da quantidade de fármaco presente na formulação.

Tabela 5 – Linearização dos perfis de dissolução, ajustados de acordo com o coeficiente de correlação de Pearson para as formulações F1 a F7.

Formulação	Ordem/Modelo				
	Zero ordem	Primeira ordem	Higuchi	Korsmeyer-Peppas	Hixson-Crowell
F1	0,418	0,511	0,982	0,992	0,483
F2	0,743	0,789	0,994	0,985	0,974
F3	0,495	0,564	0,983	0,978	0,543
F4	0,679	0,726	0,956	0,861	0,712
F5	0,762	0,804	0,962	0,873	0,791
F6	0,947	0,976	0,896	0,968	0,969
F7	0,948	0,983	0,882	0,975	0,978

4.3 ATIVIDADE MICROBIOLÓGICA

Os ensaios microbiológicos foram realizados para verificar a atividade microbiológica/antifúngica das formulações e das soluções de controle.

Para tal fim, foram elencados os dois microrganismos, as espécies *Candida albicans* e *Trichophyton mentagrophytes*, sendo o primeiro classificado como levedura e o último como fungo filamentoso (1, 51, 88, 89).

Os fungos filamentosos são chamados de dermatófitos e são os agentes etiológicos mais comuns das onicomicoses em climas moderados, sendo que em climas tropicais os mais comuns são os bolores e o gênero *Candida* spp. (23).

As leveduras do gênero *Candida* spp. são microrganismos que afetam membranas mucosas, pele e unhas, podendo oportunizar a candidíase mucocutânea crônica que provoca inchaço, vermelhidão, infecções persistentes e recorrentes, a qual é de difícil tratamento. Este tipo de candidíase quando envolve a lâmina ungueal pode manifestar-se de forma mais complicada, produzindo distorção, espessamento e fragmentação das unhas, com inchaço crônico da falange distal (18, 90). Daí a relevância e necessidade de estudar estes microrganismos.

4.3.1 Teste de Difusão em Poço

Os resultados obtidos quanto à espécie *Candida albicans* revelaram que todas as formulações formaram halos de inibição (cf. Tabela 6 e Gráfico 7), atestando a atividade microbiológica do timol. Entretanto, assim como observado no ensaio de liberação, os insumos adicionados às fórmulações desempenharam papel

importante no ensaio microbiológico. As formulações F2 e F7 foram as que apresentaram as maiores médias de inibição $26,40 \pm 1,80\text{mm}$ e $22,50 \pm 2,50\text{mm}$, e em comparação com o timol $23,00 \pm 1,60\text{mm}$ (cf. Figura 13), a F2 o superou e a F7 teve valor de inibição semelhante. Demonstrando, assim, que a presença de maior concentração do agente plastificante ácido cítrico na formulação, permite maior efeito antimicrobiano (cf. Gráfico 8). Essa ação pode ser atribuída também à potencialização do efeito antimicrobiano do copolímero Eudragit® E 100, pois entre as soluções de controle, o referido copolímero destacou-se apresentando uma pequena inibição $8,30 \pm 1,50\text{mm}$. Quanto ao controle solvente, embora tenha apresentado uma modesta inibição, esta é pouco expressiva em virtude da sua volatilidade.

Para *Candida albicans*, a análise estatística dos valores obtidos confirmou diferença significativa entre as médias com valor de $P < 0,0001$ (ANOVA), comprovando assim a efetividade das formulações frente a este microrganismo.

Tabela 6 – Atividade microbiológica quanto à espécie *Candida albicans*

Formulação	Média halos de inibição (mm)	Desvio padrão (mm)
Timol	23,00	1,60
Eudragit® E 100	8,30	1,50
Álcool	6,00	1,00
F1	15,80	2,00
F2	26,40	1,80
F3	17,30	1,60
F4	18,40	2,40
F5	20,50	0,40
F6	15,70	3,30
F7	22,50	2,50

$P < 0,0001$ (ANOVA)

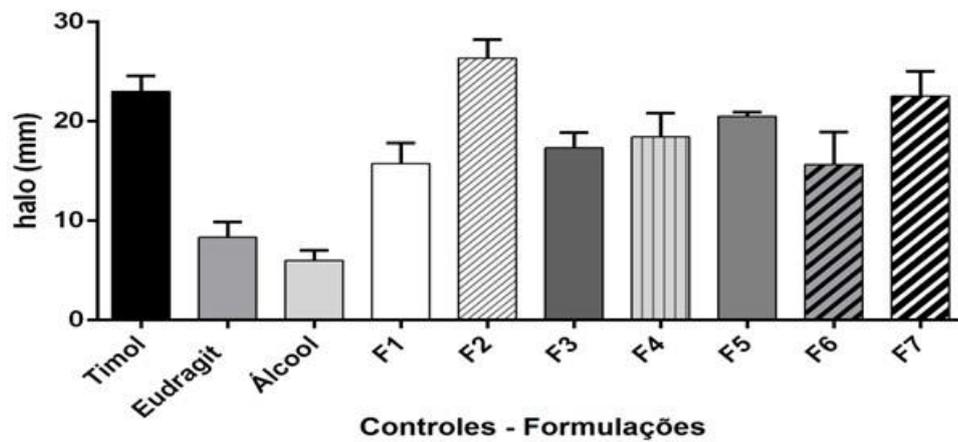


Gráfico 7 – Atividade microbiológica quanto à espécie *Candida albicans*. As barras representam as médias do halo de inibição (mm) e as barras de erro, os desvios-padrão.

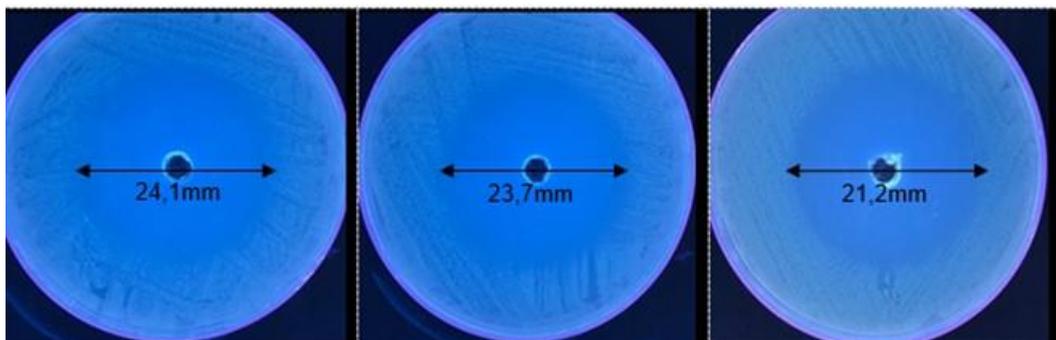
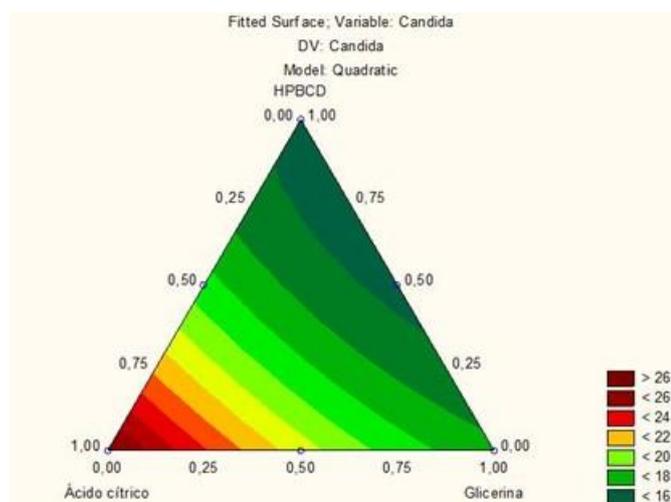


Figura 13 – Fotografias das placas com os halos de inibição de timol para *Candida albicans*.



$$V = 26,4x + 17,3y + 15,8z - 5,4xy - 10,8xz - 3,4yz \quad R^2 = 1$$

Gráfico 8 – Gráfico de contorno obtido para variável ensaio microbiológico com *Candida albicans* do desenho de mistura com os agentes solubilizantes do esmalte antifúngico de Eudragit® E contendo timol: ácido cítrico (x), glicerina (y) e HPBCD (z).

Todas as formulações tiveram a formação de halos de inibição com relação à espécie *Trichophyton mentagrophytes*. Na figura 14, esse ensaio é ilustrado de forma representativa, com a exposição do menor halo observado entre as fórmulas (F6). As formulações F5 e F2, que apresentam ácido cítrico, proporcionaram a formação de halos maiores, com médias de inibição (*cf.* Gráfico 9 e Gráfico 10) de $60,20 \pm 0,20\text{mm}$ e $53,60 \pm 12,00\text{mm}$, respectivamente. Em comparação com o resultado da média dos halos de inibição do timol, todas as formulações superaram este valor, indicando assim que, quanto ao fungo filamentososo, o fármaco em combinação com os excipientes teve ação mais expressiva, o que pode ser justificado pela presença do copolímero, que por sua vez também apresentou halo de inibição bastante representativo ($17,40 \pm 0,40\text{mm}$). O solvente presente nas fórmulas (álcool etílico 90%) apresentou um pequeno halo inibição ($4,10 \pm 5,70\text{mm}$), provavelmente devido a sua alta concentração de 90%.

Com relação à espécie *Trichophyton mentagrophytes*, a análise estatística dos valores obtidos também confirmou diferença significativa entre as médias com valor de $P < 0,0001$ (ANOVA), sendo que em teste de Tukey com comparações múltiplas tem-se a confirmação que todas apresentam efetividade, entretanto as de melhor efetividade frente ao fungo filamentososo analisado são as formulações de esmalte F5, F2 e F7, respectivamente nesta ordem.

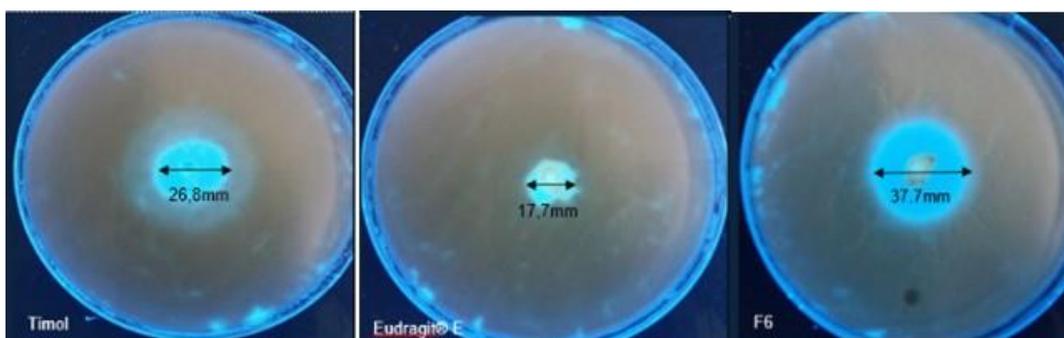


Figura 14 – Fotografias representativas das placas com os halos de inibição para *Trichophyton mentagrophytes*. F6 formulação de esmalte de Eudragit® E contendo timol e agentes solubilizantes (HPBCD e glicerina).

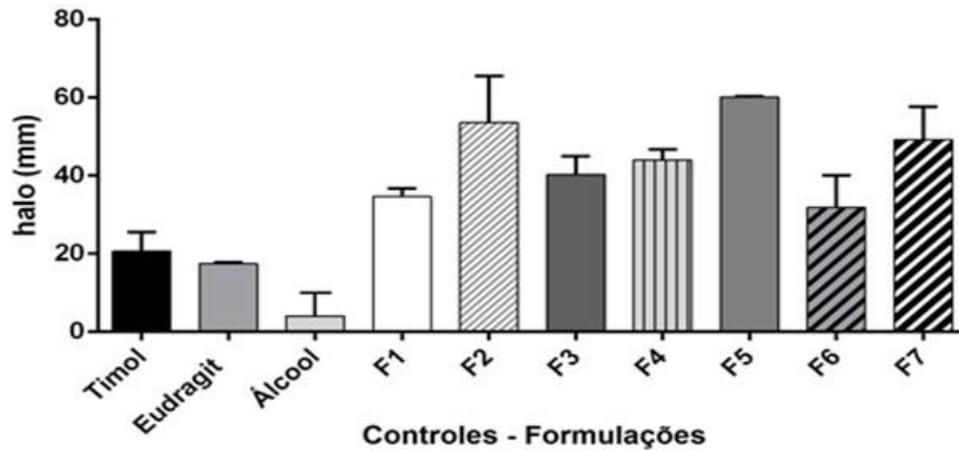
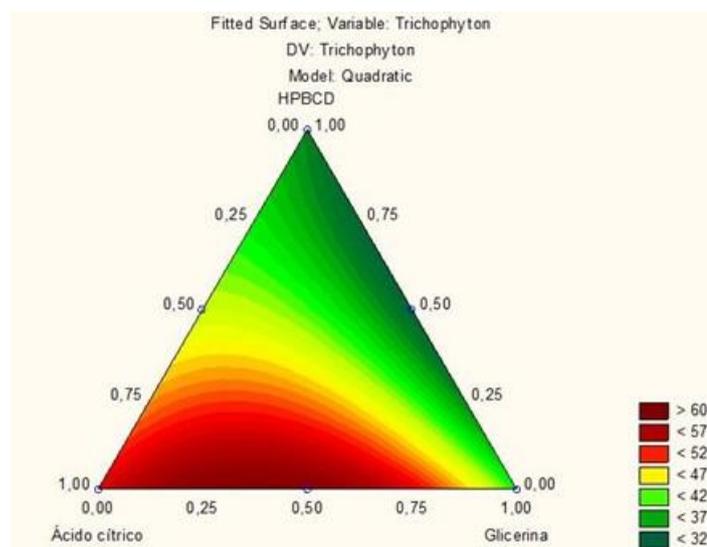


Gráfico 9 – Atividade microbiológica quanto à espécie *Trichophyton mentagrophytes*. As barras representam as médias do halo de inibição (mm) e as barras de erro, os desvios-padrão.



$$V = 53,6x + 40,3y + 34,7z + 53xy - 0,6xz - 22,4yz \quad R^2 = 1$$

Gráfico 10 – Gráfico de contorno obtido para variável ensaio microbiológico com *Trichophyton mentagrophytes* do desenho de mistura com os agentes solubilizantes do esmalte antifúngico de Eudragit® E contendo timol: ácido cítrico (x), glicerina (y) e HPBCD (z).

No estudo de Paradkar *et al.* (2015) desenvolveram e avaliaram formulações de spray transdérmico com clotrimazol para verificar atividade antifúngica, e como resultado obtiveram uma formulação que continha Eudragit® E 100 e uma mistura de álcool e acetona (80:20) como a que melhor apresentou tal ação em relação a *Candida albicans*. Este fato vem corroborar com o resultado apresentado no presente estudo quanto à inibição apresentada pelo Eudragit® E 100 frente aos dois microrganismos avaliados (91).

5 CONCLUSÃO

O desenvolvimento da formulação de esmalte antifúngico contendo Eudragit® E 100 e timol possibilitou a elaboração de uma forma farmacêutica inovadora, eficaz e segura para o tratamento da onicomicose.

Embora existam formulações na forma de esmalte medicamentoso para tal patologia, no mercado brasileiro não se encontra medicamento de uso tópico que tenha na sua composição como base o copolímero acrílico catiônico Eudragit® E 100. Assim, o este estudo resultou em um esmalte medicamentoso que apresentou compatibilidade entre o fármaco e os excipientes solubilizantes escolhidos: 2-hidroxiopropil-beta-ciclodextrina, ácido cítrico e glicerina, para sua elaboração.

A partir do desenho de mistura foi possível elaborar as formulações e avaliar as qualidades físico-químicas e microbiológicas, sendo que as características estéticas foram as primeiras a delinear a funcionalidade das mesmas, como por exemplo, os filmes formados pelas formulações de esmalte apresentaram aspecto brilhoso, textura não pegajosa e de coloração clara. Estes filmes quando submetidos aos demais ensaios de caracterização, foram avaliados quanto ao tempo de secagem, microscopia óptica, resistência à água, ensaio de liberação em células de difusão (*in vitro*) e análise microbiológica.

Com isto, foi constatado que a formulação de esmalte desenvolvida com todos os excipientes elencados para tal estudo, a denominada F7 apresentou os melhores resultados físico-químicos e microbiológicos, pois o tempo de secagem do seu filme foi conforme o que se preconiza para tal forma farmacêutica na literatura, de 60 a 120 segundos, a imagem microscópica apresentou um filme liso e homogêneo e quanto à resistência à água revelou 29,80% de perda de massa, entretanto tal porcentagem não inviabiliza sua efetividade uma vez que é de uso diário.

No ensaio de liberação em células de difusão, foi a formulação de esmalte F7 que exibiu maior porcentagem de liberação no período de 24 horas, isto é, a quantidade de fármaco liberado é satisfatória em comparação com as demais formulações que apresentaram porcentagens menores de liberação do fármaco.

E finalmente, no ensaio microbiológico, foi constatado que todas as formulações apresentaram halos de inibição frente aos microrganismos avaliados,

Candida albicans e *Trichophyton mentagrophytes*, porém a formulação F7 obteve melhores resultados quanto aos dois microrganismos.

Assim sendo, o presente estudo demonstrou que o desenvolvimento da formulação de esmalte contendo Eudragit® E 100, timol e todos os excipientes analisados (F7) apresentou resultados favoráveis que comprovaram sua compatibilidade e efetividade.

REFERÊNCIAS

1. Baran R, Nakamura R. Doenças da unha: do diagnóstico ao tratamento. Rio de Janeiro, Brasil: Elsevier; 2011.
2. Gomes S, Lencastre A, Lopes MJP. Alterações ungueais em Pediatria. *Nascer e Crescer*. 2012; 21 (1): 19-24. Disponível em: http://www.scielo.mec.pt/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0872-07542012000100004. [Acesso em 28 nov. 2018].
3. Tosti A. Nails: diagnosis, therapy, surgery. Oxford: Elsevier Saunders; 2005.
4. Steiner D, Gasques L, Gatti EF. Micose ungueal. *Moreira Jr Editora | RBM Revista Brasileira de Medicina*. 2014; 71 (12): 95-99. Disponível em: www.moreirajr.com.br/revistas.asp?fase=r003&id_materia=5964 [Acesso em 21 abr. 2018].
5. Azambuja W. Timol - Óleos Essenciais - O Guia do Brasil. Disponível em: <http://www.oleosessenciais.org/timol/> [Acesso em 21 abr. 2018].
6. Krishna GS, Kumar PP, Murugan KB. Nail as a promising drug delivery system for controlled release. *IJPSR*. 2013; 4 (3): 907-915.
7. Marieb EN. Anatomía y Fisiología Humana. Madrid: Pearson Educación, S. A; 2008. Disponível em: <http://www.educacion-holistica.org/notepad/documentos/Medicina/Anatomia/Anatomia%20y%20Fisiologia%20Humana.pdf> [Acesso em 9 abr. 2018].
8. De Berker D. Nail anatomy. *Clinics in dermatology*. 2013; 31 (5): 509-515. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24079579>. [Acesso em 28 nov. 2018].
9. Sanches TP. Estudo sobre determinação de elementos químicos em unhas humanas pelo método de análise por ativação com nêutrons. Dissertação de mestrado em Ciências na Área de Tecnologia Nuclear – Aplicações do Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares da Universidade de São Paulo, 2012. Disponível em: <http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/85/85131/tde-23102012-153919/pt-br.php>. [Acesso em 28 nov 2018].
10. Montanari, T. Histologia: texto, atlas e roteiro de aulas práticas. 3. Ed. Porto Alegre: Edição do Autor, 2016. 229 p. [online]. Disponível em: <http://www.ufrgs.br/livrodehisto/pdfs/livrodehisto.pdf> [Acesso em 26 dez. 2018].

11. Rivitti E. Manual de Dermatologia Clínica de Sampaio e Rivitti. Porto Alegre: Artes Médicas; 2014. Disponível em: <https://medicalopium.blogspot.com/2017/03/dermatologia-sampaio-e-rivitti-2-edicao.html> [Acesso em 9 abr. 2018].
12. Junqueira LC, Carneiro J. Histologia básica: texto/atlas. 12 ed. Guanabara Koogan; 2013. Disponível em: <https://ia801601.us.archive.org/21/items/HistologiaBasicaTextoEAtlasJunqueiraCarneiro12rEd/%E2%97%8F%E2%97%8F%20Histologia%20B%C3%A1sica%20C%20Texto%20e%20Atlas%20%20Junqueira%20%26%20Carneiro%20%2012%20C2%AA%20Ed.pdf>. [Acesso em 21 abr. 2018].
13. Sociedade Brasileira de Cirurgia [homepage na internet]. Fisiologia da Unha. Disponível em: <http://www.sbcd.org.br/pagina/1607> [Acesso em 9 abr. 2018].
14. Sociedade Brasileira de Dermatologia [homepage na internet]. Cuidados com as unhas. Disponível em: <http://www.sbd.org.br/dermatologia/unha/cuidados/cuidados-com-as-unhas/> [Acesso em 21 abr. 2018].
15. Sociedade Brasileira de Dermatologia [homepage na internet]. Doenças e problemas. Disponível em: <http://www.sbd.org.br/dermatologia/unhas/doencas-e-problemas/> [Acesso em 21 abr. 2018].
16. Sociedade Brasileira de Dermatologia [homepage na internet]. Manual de conduta nas onicomicoses. Disponível em: <https://pt.scribd.com/document/47411922/Manual-de-Condu%C3%A7%C3%A3o-nas-Onicomicoses> [Acesso em 21 abr. 2018].
17. Peres NTA, Rossi A, Maranhão FCH, Rossi NMM. Dermatophytes: host-pathogen interaction and antifungal resistance. Anais brasileiros de dermatologia. 2010; 85 (5): 657-667. Disponível em: <http://www.scielo.br/pdf/abd/v85n5/v85n05a09.pdf>. [Acesso em 17 mai. 2018].
18. Oliveira SBB. Perfil de suscetibilidade antifúngica e fatores de virulência de leveduras isoladas de onicomicose de pacientes atendidos no Laboratório Central do Estado do Pará (LACEN). Dissertação de mestrado apresentada ao programa de Pós-Graduação em Neurociências e Biologia Celular, do instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Pará. 2014. Disponível em: http://repositorio.ufpa.br/jspui/bitstream/2011/5477/1/Dissertacao_PerfilSuscetibilidadeAntifungica.pdf. [Acesso em 06 jun. 2018].
19. Schalka S, Nunes S, Gomes Neto A. Comparative clinical evaluation of efficacy and safety of a formulation containing ciclopirox 8% in the form of a therapeutic nail lacquer in two different posologies for the treatment of onychomycosis of the

- toes. Anais brasileiros de Dermatologia. 2012; 87 (1): 19-25. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22481647>. [Acesso em 06 jun. 2018].
20. Kioshima ES, Oliveira ACP, Svidzinski TIE. Onicomicoses: do diagnóstico ao tratamento. Arquivos de Ciências da Saúde Unipar. 2002; 6 (2): 159-163. Disponível em: <http://revistas.unipar.br/index.php/saude/article/view/1173/10> 35. [Acesso em 06 jun. 2018].
21. Araújo AJG, Souza MAJ, Bastos OMP, Oliveira JC. Onychomycosis caused by emergente fungi: clinical analysis, diagnosis and revision. Anais brasileiros de Dermatologia. 2003; 78 (4): 445-455. Disponível em: <http://www.scielo.br/pdf/abd/v78n4/16905.pdf>. [Acesso em 28 nov. 2018]
22. Minotto R, Corte LD, Millán T, Furtado BC. Nail Diseases. In: Dermatology in Public Health Environments. Springer. 2018: 1433-1450.
23. Silva ST. Alterações ungueais. Caparica – Portugal. Dissertação de mestrado em Ciências Farmacêuticas do Instituto Egas Moniz; 2014. Disponível em: <http://hdl.handle.net/10400.26/13090> [Acesso em 17 mai. 2018].
24. Colombo AL, Guimarães T. Epidemiologia das infecções hematogênicas por *Candida* spp. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical. 2003; 36 (5): 599-607. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1590/s0037-86822003000500010>. [Acesso em 28 nov. 2018].
25. Leite Júnior DP, Yamamoto ACA, Martins ER, Teixeira AFR, Hahn RC. Leveduras do gênero *Candida* isoladas de sítios anatomicamente distintos de profissionais militares em Cuiabá (MT), Brasil. Anais Brasileiros de Dermatologia. 2011; 86 (4): 675-680. Disponível em: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0365-05962011000400008&lng=en. [Acesso em 28 nov. 2018]
26. Crocco EI, Mimica LMJ, Muramoto LH, Garcia C, Souza VM, Ruiz LRB, Zaitz C. Identificação de espécies de *Candida* e susceptibilidade antifúngica *in vitro*: estudo de 100 pacientes com candidíases superficiais. Anais Brasileiros de Dermatologia. 2004; 79 (6): 689-697. Disponível em: <http://www.scielo.br/pdf/abd/v79n6/a05v79n6.pdf>. [Acesso em 28 nov. 2018]
27. Lima KM, Rego RSM, Montenegro F. Espécies fúngicas isoladas a partir de unhas de manipuladores de alimentos. Rev. Bras. Anal. Clin. 2007; 39 (3): 193-196. Disponível em:

- http://micologia.com.br/pdf/Especies_fungicas_unhas_manipuladores.pdf. [Acesso em 28 nov. 2018].
28. Rotta I. Eficácia e segurança comparativas do uso de antifúngicos tópicos no tratamento de dermatomicoses: meta-análise de ensaios clínicos randomizados. 2011. Dissertação de mestrado no Curso de Farmácia da Universidade Federal do Paraná. Curitiba; 2011. Disponível em: <https://acervodigital.ufpr.br/bitstream/handle/1884/26360/Eficacia%20e%20seguranca%20comparativas%20do%20uso%20de%20antifungicos%20topico%20no%20tratamento%20de%20dermatomicoses%20-%20meta-analise%20de%20ensai%20io~1.pdf?sequence=1&isAllowed=y>. [Acesso em 28 nov. 2018].
 29. Dinâmica Química Contemporânea [homepage na internet]. Ficha técnica do timol. Disponível em: <http://dinamicaquimica.com.br/freagentes/TIMOL.pdf> [Acesso em 17 mai. 2018].
 30. Sociedade Brasileira de Química [homepage na internet]. Timol. Disponível em: <http://qnint.sbq.org.br/novo/index.php?hash=molecula.195> [Acesso em 21 abr. 2018].
 31. Rowe RC, Sheskey PJ, Quinn ME. Handbook of Pharmaceutical Excipients. Chicago: Pharmaceutical Press; 2009. Disponível em: <http://iupac2009.org/book/handbook-of-pharmaceutical-excipients-8th-edition> [Acesso em 21 abr 2018].
 32. Zamania Z, Alipoura D, Moghimib HR, Mortazavib SAR, Saffar M. Development and Evaluation of Thymol Microparticles Using Cellulose Derivatives as Controlled Release Dosage Form. Iranian Journal of Pharmaceutical Research. [Online] 2015;14 (4): 1031-1040. Disponível em: <https://www.semantic-scholar.org/paper/Development-and-Evaluation-of-Thymol-Microparticles-Zamani-Alipour/12f5d755faea53cd651d5de1489b7e8274def0cd> [Acesso em 21 abr. 2018].
 33. Shin S, Kim JH. Antifungal activities of essential oils from *Thymus quinquecostatus* and *T. magnus*. Planta Med 2004; 70 (11): 1090–1092. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15549669> [Acesso em 21 abr. 2018].
 34. Braga PC, Culici M, Alfieri M, Dal Sasso M. Thymol inhibits *Candida albicans* biofilm formation and mature biofilm. International Journal Antimicrobial Agents. 2008; 31: 472-477. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0924857908000289>. [Acesso em 28 nov. 2018].

35. Romero A, Specian V, Oliveira RC, Diniz, SPS. Atividade do Óleo essencial de Tomilho (*Thymus vulgaris* L.) contra fungos fitopatogênicos. UNOPAR Científica. 2009; 11 (4): 15-18. Disponível em: <https://pt.scribd.com/document/91423827/03-Atividade-Do-Oleo-Essencial-de-Tomilhothymus-Vulgaris-I-Contra-Fungos-Fitopatogenicos>. [Acesso em 28 nov. 2018].
36. Almeida LFD, Cavalcanti YW, Castro RD, Lima EO. Atividade antifúngica de óleos essenciais frente a amostras clínicas de *Candida albicans* isoladas de pacientes HIV positivos. Revista Brasileira de Plantas Mediciniais. 2012; 14 (4): 649-655. Disponível em: <https://repositorio.unesp.br/handle/11449/16783>. [Acesso em 28 nov. 2018].
37. Silva AA, Anjos MM, Ruiz SP, Panice LB, Mikcha JMG, Junior MM, Abreu Filho BA. Avaliação da atividade antimicrobiana dos óleos essenciais de *Thymus vulgaris* (tomilho), *Syzygium aromaticum* (cravo-da-índia) e *Rosmarinus officinalis* (alecrim) e dos conservantes benzoato de sódio e sorbato de potássio em *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*. Boletim do Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos. 2015; 33 (1): 15-18. Disponível em: <https://revistas.ufpr.br/alimentos/article/view/43814>. [Acesso em 28 nov. 2018].
38. Cleff MB, Meinerz AR, Faria RO, Xavier MO, Santin R, Nascente PS, Rodrigues MR, Meireles MCA. Atividade inibitória do óleo essencial de orégano em fungos de importância médica e veterinária. Arq. Bras. Med. Vet. Zootec. 2010; 62 (5): 1291-1294. Disponível em: <http://repositorio.furg.br/handle/1/2655>. [Acesso em 28 nov. 2018].
39. Silva JPL, Almeida JMD, Perez DV, Franco BDGM. Óleo essencial de orégano: interferência da composição química na atividade frente a *Salmonella Enteritidis*. Ciência Tecnol Aliment. 2003; 30: 136- 141. Disponível em: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S010120612010000500021. [Acesso em 28 nov. 2018].
40. Evonikcom. Evonikcom. [Online]. Disponível em: <http://history.evonik.com/sites/geschichte/en/inventions/eudragit/> [Acesso em 21 abr. 2018].
41. Kadian SS, Harikumar SL. Eudragit and its Pharmaceutical Significance. [Online] 2009. Disponível em: <http://www.pharmainfo.net/satishsinghkadian/publications/eudragit-and-its-pharmaceutical-significance>. [Acesso em 21 abr. 2018].
42. Sá Barreto LCL. Utilidad de algunos copolímeros acrílicos para el control de liberación de fármacos en pelets matriciales elaborados por

- extrusõesferonización. Universidad de Santiago de Compostela, Facultad de Farmacia; 2009.
43. Evonikcom. Evonikcom. [Online]. Disponível em: <http://eudragit.evonik.com/product/eudragit/en/productsservices/eudragit-products/Pages/default.aspx> [Acesso em 23 out. 2018].
 44. Evonikcom. Evonikcom. [Online]. Disponível em: http://healthcare.evonik.com/sites/lists/nc/documentshc/evonik-eudragit_brochure.pdf [Acesso em 21 abr. 2018].
 45. Evonikcom. Evonikcom. [Online]. Disponível em: <http://s9423e139345e2186.jimcontent.com/download/version/1458814353/module/10453336098/name/TI-EUDRAGIT-E-100-E-PO-E-12-5-EN.pdf> [Acesso em 21 abr. 2018].
 46. Villanova JCO, Orefice RL, Cunha, AS. Aplicações farmacêuticas de polímeros. *Polímeros: Ciência e Tecnologia* 2010; 20 (1): 51-64. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0104-14282010000100012&script=sciabstract&lng=pt> [Acesso em 21 abr. 2018].
 47. Patra CN, Priya R, Swain S, Jena GK, Panigrahi KC, Ghose D. Pharmaceutical significance of Eudragit: a review. *Future Journal of Pharmaceutical sciences*. 2017. doi: 10.1016/j.fjps.2017.02.001.
 48. Tipe D, Vavia P. Optimization & Stability Study of an EUDRAGIT E100® Based Transdermal Therapeutic System of Nitrendipine. *Drug Delivery Technology* 2002; 2 (3). Disponível em: <http://www.drug-dev.com/Main/Back-Issues/Optimization-Stability-Study-of-an-EUDRAGIT-E100SU-410.aspx> [Acesso em 21 abr. 2018].
 49. Frank LA. Avaliação da performance e caracterização in vitro de diferentes hidrogéis de quitosana contendo nanocápsulas poliméricas para aplicação vaginal. Dissertação de mestrado submetida ao programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre-RS, 2014. Disponível em: <https://lume.ufrgs.br/handle/10183/144066> [Acesso em 07 mai. 2018].
 50. Chaves OS. Desenvolvimento de formulações nanotecnológicas mucoadesivas para administração sublingual de carvedilol. Tese de doutorado submetida ao programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre-RS, 2017. Disponível em: <https://www.lume.ufrgs.br/handle/10183/175138>. [Acesso em 07 mai. 2018].

51. Patel MM, Vora, ZM. Formulation development and optimization of transungual drug delivery system of terbinafine hydrochloride for the treatment of onychomycosis. *Drug Deliv. and Transl. Res.* 2016; 6:263–275. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26926242>. [Acesso em 21 abr. 2018].
52. El-sherif NI, Shamma RN, Ghada A. In-situ gels and nail lacquers as potential delivery systems for treatment of onychomycosis. A comparative study. *Journal of Drug Delivery Science and Technology.* 2018; 43: 253-261. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jddst.2017.10.018>. [Acesso em 07 mai. 2018].
53. Murdan S. Drug delivery to the nail following topical application, *Int J Pharm.* 2001; 236: 1–26. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11891066> [Acesso em 07 mai. 2018].
54. Hui X, Chan TCK, Barbadillo S, Lee C, Maibach HI, Wester RC. Enhanced econazole penetration into human nail by 2-n-Nonyl-1,3-dioxolane. *Journal of Pharmaceutical Sciences.* 2003; 92 (1):142-148. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12486690>. [Acesso em 07 mai. 2018].
55. Scherer KDG. Atividade antifúngica do óleo essencial *Syzygium aromaticum* (cravo da Índia) em agentes causadores de onicomicoses. Trabalho de Conclusão de Curso de Farmácia, Universidade de Santa Cruz do Sul. Santa Cruz do Sul; 2017. Disponível em: <https://repositorio.unisc.br/jspui/handle/11624/1640>. [Acesso em 28 nov. 2018].
56. Oliveira CFP, Valera TS, Dermaquette NR. Comparando a utilização de diferentes ácidos carboxílicos nos amidos termoplásticos. *Anais do 12º Congresso Brasileiro de Polímeros.* Florianópolis: 2013.
57. Companhia Ambiental do Estado de São Paulo [homepage na internet]. Ficha técnica do álcool etílico. Disponível em: http://sistemasinter.cetesb.sp.gov.br/produtos/ficha_completa1.asp?consulta=%C1LCOOL%20ET%CDLICO [Acesso em 14 nov. 2018].
58. BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Guia de controle de qualidade de produtos cosméticos; 2 ed. Brasília: ANVISA; 2008.
59. Padro Filho LG, Sabbagh M. Equipamento experimental para determinação de isotermas de adsorção pelo método dinâmico. *Sci. agric.* 1993; 50 (3): 455-459. Disponível em: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0103-90161993000300019 [Acesso em 07 mai. 2018].

60. Pires FQ. Development of lipid nanoparticles loading thymol and *Lippia origanoides* essential oil in inclusion complexes with cyclodextrin. Dissertação de mestrado submetida ao Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade de Brasília, Brasília-DF, 2018.
61. Marcolongo R. Dissolução de medicamentos: fundamentos, aplicações, aspectos regulatórios e perspectivas na área farmacêutica. Dissertação de mestrado submetida ao Programa de Pós-graduação em Fármaco e Medicamentos da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo, São Paulo-SP; 2003. Disponível em: www.teses.usp.br/teses/disponiveis/9/9139/tde-19012004.../Marcolongo_Raquel.pdf [Acesso em 18 jun. 2018].
62. ANVISA - NCCLS. Método de Referência para Testes de Diluição em Caldo para a Determinação da Sensibilidade a Terapia Antifúngica das Leveduras; Norma Aprovada. 2 ed. Norma M27-A2 do NCCLS. Pensilvania: NCCLS 22 (15); 2002.
63. ANVISA - NCCLS. Método de Referência para Testes de Diluição em Caldo para a Determinação da Sensibilidade a Terapia Antifúngica dos Fungos Filamentosos: Norma Aprovada. Norma M38-A do NCCLS. Pensilvania: NCCLS 22 (16); 2002.
64. Campos DA, Alves ND, Silva TD. Estudo de pré-formulação e desenvolvimento de pó efervescente contendo ácido acetilsalicílico. *Farmácia & Ciência*. 2012; 3: 20-33. Disponível em: https://www.unileste.edu.br/farmaciaeciencia/volume3/ARTIGO_2_VOL_3_%20F_C.pdf. [Acesso em 28 set. 2018]
65. Matos APS. Estudo de pré-formulação e desenvolvimento de comprimidos de liberação imediata contendo diazepam. Dissertação de mestrado em Ciências Farmacêuticas, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ); 2014.
66. Ferraz, HG. Pré-formulação (apostila) Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo (USP). Disponível em: https://edisciplinas.usp.br/pluginfile.php/3330884/mod_resource/content/1/Texto%20pr%C3%A9-formula%C3%A7%C3%A3o.pdf. [Acesso em 28 set. 2018].
67. Pires FQ, Angelo T, Silva JKR *et al.* Use of mixture design in drug-excipient compatibility determinations: Thymol nanoparticles case study. *J Pharm Biomed Anal*. 2017; 137:196–203.
68. Cevallos PAP, Buera MP, Elizalde BE Encapsulation of cinnamon and thyme essential oils components (cinnamaldehyde and thymol) in β -cyclodextrin: Effect

- of interactions with water on complex stability. *Journal of Food Engineering*. 2010; 99: 70–75.
69. Lima JR, Alves LDS, Santana DP. Complexos de inclusão como estratégia para veiculação de óleos essenciais. *Rev. Bras. Farm.* 2012; 93 (4): 397-402.
70. Nieddu M., Rattu G., Boatto G., Bosi P., Trevisi P., Giunchedi P., Carta A., Gavini E. Improvement of thymol properties by complexation with cyclodextrins: *in vitro* and *in vivo* studies. *Carbohydr. Polym.* 2014; 102: 393-399.
71. Lu P, Zhang M, Liu Y, Li J, Xin M. Characteristics of vermiculite-reinforced thermoplastic starch composition films. *Journal of Applied Polymer Science*. 2012. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/pdf/10.1002/app.36342>. [Acesso em 21 nov. 2018].
72. Silva TS, Tristão MS, Andrade Neto MC, Freitas PL, Pereira TDL, Pimenta TS, Ferreira DC. Produção de esmaltes comuns de unhas. Universidade de Uberaba. 2011. Disponível em: <https://www.uniube.br/eventos/entec/2011/arquivos/quimica5.pdf>. [Acesso em 28 set. 2018].
73. Leonardi GR, Gaspar LR, Campos PMBM. Estudo da variação do pH da pele humana exposta à formulação cosmética acrescida ou não das vitaminas A, E ou de ceramida, por metodologia não invasiva. *An Brás Dermatol.* 2002; 77 (5): 563-569. Disponível em: <http://www.scielo.br/pdf/abd/v77n5/v77n5a06.pdf>. [Acesso em 31 out. 2018].
74. Galembeck F, Csordas Y. *Cosméticos: a química da beleza*. 2010. Disponível em: http://web.ccead.puc-rio.br/condigital/mvsl/Sala%20de%20Leitura/conteúdos/SL_cosmeticos.pdf. Acesso em [Acesso em 28 set. 2018].
75. Zhang Y, Niu Y, Luo Y, Ge M, Yang T, Yu L, Wang Q. Fabrication, characterization and antimicrobial activities of thymol-loaded zein nanoparticles stabilized by sodium caseinate–chitosan hydrochloride double layers. *Food Chemistry* 142 (2014) 269–275. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0308814613009874>. [Acesso em 01 dez. 2018].
76. Shah B, Davidson PM, Zhong Q. Antimicrobial Activity of Nanodispersed Thymol in Tryptic Soy Broth. *Journal of Food Protection*. 2013; 76 (3): 440-447. Disponível em: <http://jfoodprotection.org/doi/pdf/10.4315/0362-028X.JFP-12-354>. [Acesso em 01 dez. 2018].

77. Joshi M., Sharma V., Pathak K. Matrix based system of isotretinoin as nail lacquer to enhance transungual delivery across human nail plate, *Int. J. Pharm.* 2014; 478 (1): 268–277. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25445993>. [Acesso em 18 jun. 2018]
78. Khattab A., Shalaby S. Optimized Ciclopirox-Based Eudragit RLPO Nail Lacquer: Effect of Endopeptidase Enzyme as Permeation Enhancer on Transungual Drug Delivery and Efficiency Against Onychomycosis *AAPS PharmSciTech.* 2018; 19 (3): 1048-1060. Disponível em: <https://doi.org/10.1208/s12249-017-0917-8>. [Acesso em 18 jun. 2018].
79. Kushwaha, A.S., Repka, M.A. & Narasimha Murthy, S. A Novel Apremilast Nail Lacquer Formulation for the Treatment of Nail Psoriasis *AAPS PharmSciTech.* 2017; 18 (8): 2949-2956. Disponível em: <https://doi.org/10.1208/s12249-017-0776-3>. [Acesso em 18 jun. 2018]
80. Gómez EC, Igea SA, Charro MBD, Amoza JLG, Espinar FJO. Effect on Nail Structure and Transungual Permeability of the Ethanol and Poloxamer Ratio from Cyclodextrin-Soluble Polypseudotaxanes Based Nail Lacquer. *Pharmaceutics.* 2018; 10 (156): 1-15. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30208659>. [Acesso em 28 set. 2018].
81. Šveikauskaitė I, Briedis V. Effect of Film-Forming Polymers on Release of Naftifine Hydrochloride from Nail Lacquers. *International Journal of Polymer Science.* 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1155/2017/1476270>. [Acesso em 07 mai. 2018].
82. Goldenstein H. Microscopia óptica. Disponível em: http://www.angelfire.com/crazy3/qfl2308/1_multipart_xF8FF_6_Microscopia_otica.pdf. [Acesso em 31 out. 2018].
83. Vieira FS. Introdução à Microscopia. São Cristóvão: Universidade Federal de Sergipe – CESAD; 2008. Disponível em: http://www.cesadufs.com.br/ORBI/public/uploadCatalogo/11371626022014Introducao_a_Microscopia_Aula_1.pdf. [Acesso em 31 out. 2018].
84. Universidade de São Paulo (USP). Instituto de Física de São Carlos (IFSC). Microbiologia. Microscopia óptica e variedade da morfologia celular. Apostila aula prática; 2018. <http://biologia.ifsc.usp.br/micro/roteiro/roteiro0>. [Acesso em 31 out. 2018].

85. Kerai LV, Hilton S, Murdan S. UV-curable gel formulations: Potential drug carriers for the topical treatment of nail diseases. *International Journal of Pharmaceutics*. 2015; 492 (1-2): 177-190. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26187167>. [Acesso em 28 set. 2018].
86. Ferreira AO. Desenvolvimento magistral de cápsulas gelatinosas duras de liberação entérica. Dissertação de mestrado do Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ). Rio de Janeiro; 2006.
87. Agência Nacional de Vigilância Sanitária - ANVISA. Resolução da Diretoria Colegiada - RDC Nº 166, de 24 de julho de 2017. Guia para validação de métodos analíticos. Brasília; 2017.
88. Tanriverdi ST, Polat SH, Metin DY, Kandiloğlu G, Özer O. Terbinafine hydrochloride loaded liposome film formulation for treatment of onychomycosis: in vitro and in vivo evaluation. *Journal of Liposome Research*. 2016; 26 (2): 163–173. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26226352> [Acesso em 28 set. 2018].
89. Morais OO. Avaliação da eficácia do laser erbium-doped yttrium aluminium garnet (Er:YAg) associado ao esmalte de amorolfina no tratamento da onicomicose: estudo pareado e randomizado. Dissertação de Mestrado em Dermatologia pelo Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade de Brasília. Brasília; 2013. Disponível em: <http://repositorio.unb.br/handle/10482/15340>. [Acesso em 18 jun. 2018].
90. Silvy SAC. Tratamento da onicomicose através de óleos essenciais. Trabalho de Conclusão do Curso de Educação Profissional de Nível Técnico em Podologia do Instituto Brasileiro de Naturopatia Aplicada (INA). Blumenau,SC; 2016.
91. Paradkar M, Thakkar V, Soni T, Gandhi T, Gohel M. Formulation and evaluation of clotrimazole transdermal spray. *Drug Dev Ind Pharm*. 2015; Early Online: 1–8. Disponível em: DOI 10.3109/03639045.2014.1002408. [Acesso em 02 dez. 2018].