

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA  
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS  
FARMACÊUTICAS**

**Fernanda Cramer Flores**

**FORMULAÇÕES INOVADORAS DE BASE NANOTECNOLÓGICA  
PARA O TRATAMENTO TÓPICO DE MICOSES SUPERFICIAIS**

**Santa Maria, RS, Brasil.  
2016**



**Fernanda Cramer Flores**

**FORMULAÇÕES INOVADORAS DE BASE NANOTECNOLÓGICA PARA O  
TRATAMENTO TÓPICO DE MICOSES SUPERFICIAIS**

Tese apresentada ao Curso de  
Doutorado do Programa de Pós-  
Graduação em Ciências Farmacêuticas  
da Universidade Federal de Santa Maria  
(UFSM, RS), como requisito parcial  
para obtenção do título de **Doutor em  
Ciências Farmacêuticas**

**Orientador: Profa. Dra. Cristiane de Bona da Silva**

**Co-orientador: Prof. Dr. Ruy Carlos Ruver Beck**

**Santa Maria, RS  
2016**

Ficha catalográfica elaborada através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Central da UFSM, com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Flores, Fernanda Cramer  
FORMULAÇÕES INOVADORAS DE BASE NANOTECNOLÓGICA PARA O  
TRATAMENTO TÓPICO DE MICOSES SUPERFICIAIS / Fernanda  
Cramer Flores.-2016.  
224 p.; 30cm

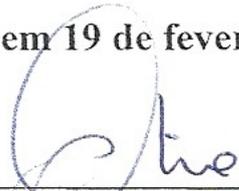
Orientadora: Cristiane de Bona da Silva  
Coorientador: Ruy Carlos Ruver Beck  
Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa  
Maria, Centro de Ciências da Saúde, Programa de Pós-  
Graduação em Ciências Farmacêuticas, RS, 2016

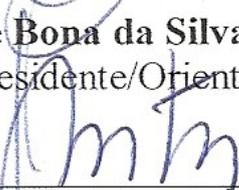
1. Tioconazol 2. Nanopartículas lipídicas 3.  
Nanopartículas poliméricas 4. Matérias-primas vegetais 5.  
Micoses superficiais I. da Silva, Cristiane de Bona II.  
Beck, Ruy Carlos Ruver III. Título.

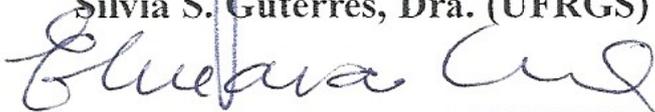
**FORMULAÇÕES INOVADORAS DE BASE NANOTECNOLÓGICA PARA O  
TRATAMENTO TÓPICO DE MICOSES SUPERFICIAIS**

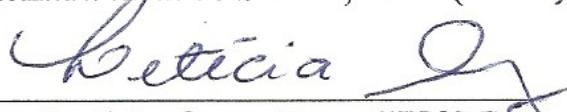
Tese apresentada ao Curso de Doutorado  
do Programa de Pós-Graduação em  
Ciências Farmacêuticas da Universidade  
Federal de Santa Maria (UFSM, RS),  
como requisito parcial para obtenção do  
título de **Doutor em Ciências  
Farmacêuticas**

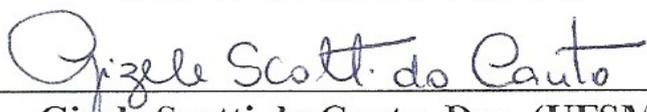
**Aprovado em 19 de fevereiro de 2016:**

  
\_\_\_\_\_  
**Cristiane de Bona da Silva, Dra. (UFSM)**  
(Presidente/Orientadora)

  
\_\_\_\_\_  
**Silvia S. Guterres, Dra. (UFRGS)**

  
\_\_\_\_\_  
**Elenara Lemos Senna, Dra. (UFSC)**

  
\_\_\_\_\_  
**Letícia Cruz, Dra. (UFSM)**

  
\_\_\_\_\_  
**Gizele Scotti do Canto, Dra. (UFSM)**



## DEDICATÓRIA

*Ao meu avô João, aos meus pais, mano e esposo pelo apoio e compreensão nos momentos mais difíceis ao longo desta jornada.*



## AGRADECIMENTOS

Neste espaço deixo os meus mais profundos agradecimentos àqueles que foram peças fundamentais na construção deste sonho.

Aos meus pais, meus maiores exemplos, incentivadores e companheiros incondicionais, os quais foram o mais profundo alicerce para que este sonho tomasse forma, dedicando sempre o maior amor do mundo. Ao mano por estar sempre “ali”.

Ao meu esposo Gabriel, pela compreensão nos momentos de ausência, pelo incentivo e companheirismo. Pela amizade, pela presença (mesmo distante), não me deixando abalar e me fortalecendo com teu carinho e amor. Não foi fácil, esta vitória também é tua!

À minha orientadora Cris, por acreditar e confiar em mim durante todos esses anos, desde a iniciação científica. Juntas sonhamos, acreditamos, nos frustramos, batalhamos e vencemos. Obrigada por estar sempre presente, pelos ensinamentos e por ser essa orientadora formidável que és! És um exemplo no qual sempre irei me espelhar na minha tão sonhada trajetória como docente.

Ao “Lab mais Mara”, um ambiente maravilhoso de convivência alegre, sadia e amiga, onde fiz amizades sinceras e duradouras, fazendo o período do doutorado ainda mais especial. Os meses de doutorado sanduíche e os momentos de escrita, tornaram-se mais difíceis longe de vocês e do nosso dia a dia. Às vizinhas do Controle e da Tecnologia. Muito obrigada, vocês abrilhantaram esse período.

Obrigada especial às minhas “curicas” Joseane e Roberta. Sem vocês tudo teria sido mais difícil e talvez impossível. Obrigada pela dedicação, companheirismo e competência! Obrigada Rose, pelo carinho e pelas unhas.

Ao professor Ruy, pela co-orientação, ensinamentos, e disposição em ajudar em cada pedaço desta Tese. Ao laboratório 405 e à Faculdade de Farmácia da UFRGS, muito obrigada.

Ao professor Sydney pela disponibilidade em sanar dúvidas e pelas cepas fúngicas.

À professora Maria Begoña, que me acolheu na Universidade de Bath, sempre auxiliando, lançando desafios, confiando no meu trabalho e abrindo as portas para que eu vivenciasse de forma extraordinária o doutorado sanduíche. Agradeço também às pessoas que se tornaram minha família nos frios dias britânicos: Alice, Sarah, James, Hilda, Wing, Gerta, Sue, Nikhill e Frederico. Vocês fizeram toda a diferença. Obrigada.

À UFSM e ao PPGCF pela infraestrutura, auxílio e dedicação dos funcionários.

Ao programa Ciência Sem Fronteiras e ao CNPq pela concessão da bolsa de Doutorado Sanduíche no Exterior.

À CAPES e à FAPERGS pela bolsa de estudos no Brasil.

Muito obrigada! Vocês fizeram esse sonho tornar realidade!

À vocês, minha eterna gratidão.



## RESUMO

### FORMULAÇÕES INOVADORAS DE BASE NANOTECNOLÓGICA PARA O TRATAMENTO TÓPICO DE MICOSES SUPERFICIAIS

AUTORA: Fernanda Cramer Flores  
ORIENTADORA: Cristiane de Bona da Silva  
CO-ORIENTADOR: Ruy Carlos Ruver Beck

Micoses superficiais são doenças fúngicas ocasionadas na pele, pelos e unhas e se encontram entre as doenças infecciosas de maior incidência e difícil tratamento, o que as torna um sério problema de saúde pública. O objetivo deste trabalho foi o desenvolvimento de formulações de base nanotecnológica, contemplando a utilização de lipídeos vegetais para a aplicação tópica de tioconazol visando o tratamento de micoses superficiais. Na primeira parte do estudo, focou-se no desenvolvimento de hidrogéis contendo Mangoesferas (nanopartículas lipídicas preparadas com manteiga de manga, óleo de melaleuca e tioconazol a 2 mg/mL), as quais foram preparadas pelo método de homogeneização a alta pressão, e também, hidrogéis contendo nanocápsulas poliméricas de óleo de copaíba, revestidas e não revestidas com quitosana com tioconazol a 1 mg/mL, obtidas por deposição interfacial do polímero pré-formado. As nanopartículas apresentaram características satisfatórias com tamanho de partícula em torno de 100 nm para as Mangoesferas e 170 nm para as nanocápsulas poliméricas; o índice de polidispersão abaixo de 0,15 para ambas; pH ligeiramente ácido; potencial zeta negativo para as Mangoesferas e nanocápsulas sem revestimento e positivo para as nanocápsulas revestidas com quitosana. O teor de tioconazol foi de 1,64-1,74 mg/mL para as Mangoesferas e 1,00 mg/mL para as nanocápsulas de copaíba. As formulações apresentaram atividade antifúngica e o controle de liberação do tioconazol foi mais pronunciado para as Mangoesferas contendo o óleo de melaleuca e para as nanocápsulas não revestidas. Após a incorporação nos hidrogéis, as nanoestruturas foram preservadas. Os hidrogéis apresentaram pH ligeiramente ácido, teor de fármaco próximo ao teórico e características de fluxo de acordo com o modelo de Casson para os hidrogéis contendo as Mangoesferas. Os hidrogéis contendo as nanocápsulas poliméricas revestidas com quitosana apresentaram modelo de fluxo do tipo Hershel-Bulkley e bioadesividade. No estudo de permeação cutânea *in vitro*, os hidrogéis contendo as Mangoesferas e as nanocápsulas de copaíba direcionaram o tioconazol para o estrato córneo, com maior retenção para os hidrogéis contendo as nanocápsulas de copaíba revestidas. A segunda etapa deste trabalho concentrou nos estudos relacionados à otimização de formulações para o tratamento de onicomicoses, iniciando com uma revisão da literatura sobre a utilização de óleos essenciais no tratamento destas infecções. Além disso, objetivou-se desenvolver uma formulação ungueal contendo tioconazol associado à nanocápsulas de triglicerídeos de cadeia média revestidas com quitosana. As nanocápsulas revestidas e não revestidas foram preparadas por deposição interfacial do polímero pré-formado e apresentaram tamanho de partícula nanométrico, índice de polidispersão adequado, com potencial zeta positivo para as nanocápsulas revestidas e negativo para as não revestidas. O teor de tioconazol foi 1,00 mg/mL e o pH das formulações levemente ácido. Ambas possibilitaram o controle da liberação do fármaco e apresentaram atividade antifúngica. A formulação ungueal apresentou características adequadas à aplicação ungueal preservando as nanoestruturas, e maior percentual de recuperação de tioconazol no estudo de penetração ungueal. A análise por microscopia confocal demonstrou uma penetração de mais de 30% da espessura ungueal a partir das formulações nanoestruturadas. Em modelo *ex vivo* de onicomicose, as formulações ungueais demonstraram-se equivalentes à formulação comercial com uma concentração de tioconazol 280 vezes menor. Ainda, a inclusão do tioconazol nas nanocápsulas reduziu o potencial irritante *in vitro* do fármaco.

Palavras-chave: Tioconazol. Nanopartículas lipídicas. Nanocápsulas poliméricas. Matérias-primas vegetais. Micoses superficiais. Penetração cutânea. Onicomicoses. Penetração ungueal.



## ABSTRACT

### INNOVATIVE NANOTECHNOLOGICAL FORMULATIONS FOR TOPICAL TREATMENT OF SUPERFICIAL MYCOSIS

AUTHOR: Fernanda Cramer Flores  
ADVISOR: Cristiane de Bona da Silva  
CO-ADVISOR: Ruy Carlos Ruver Beck

Superficial mycoses are fungal diseases caused on skin, hair and nails and are among the infectious diseases with the highest incidence and difficult to treat, making them a serious public health problem. The purpose of this study was the development of nanotechnological based formulations, contemplating the use of vegetable lipids for topical application of tioconazole, aiming the treatment of superficial mycoses. The first part of this work was focused on the development of hydrogels containing Mangospheres (lipid nanoparticles prepared with mango butter, meluca oil and tioconazole at 2 mg/mL), and hydrogels containing tioconazole-loaded copaiba oil polymeric nanocapsules, coated and uncoated with chitosan (1 mg/mL). Mangospheres were prepared by high-pressure homogenization technique and the polymeric nanocapsules by interfacial deposition of pre-formed polymer method. The nanoparticles showed adequate physicochemical characteristics. The mean particle size was around 100 nm for Mangospheres and 170 nm for copaiba oil nanocapsules. The formulations showed the polydispersity index below 0.15, slightly acid pH and negative zeta potential for Mangospheres and uncoated nanocapsules and positive for chitosan-coated nanocapsules. Tioconazole content was 1.64-1.74 mg/mL for Mangospheres and 1.00 mg/mL for copaiba nanocapsules. The formulations presented antifungal activity and a great control of tioconazole release was observed for Mangospheres containing melaleuca oil and for the uncoated nanocapsules. The nanostructures were preserved after incorporation into hydrogels. The hydrogels showed slightly acidic pH, drug content close to the theoretical values and flow characteristics in accordance with Casson model for hydrogels containing Mangospheres. The hydrogels containing the cationic-coated polymeric nanocapsules presented Hershel-Bulkley flow model and bioadhesivity. *In vitro* skin permeation studies showed tioconazole targeting to stratum corneum for the hydrogels presenting Mangospheres and copaiba oil nanocapsules, with greater retention for the hydrogels containing the coated copaiba oil nanocapsules. The second part of the present work focused on studies related to the optimization of formulations for the treatment of onychomycosis, starting with a review of the literature on the use of essential oils in treating these infections. In addition, it was aimed to develop a nail formulation containing tioconazole associated with nanocapsules of medium chain triglycerides coated with chitosan. The coated and uncoated nanocapsules were obtained by interfacial deposition of pre-formed polymer and showed nanometric size, adequate polydispersity index and positive zeta potential for the coated nanocapsules and negative for the uncoated particles. Tioconazole content was 1.00 mg/mL and pH with slightly acid values. Both formulations showed control of tioconazole release and antifungal activity. The nail formulation showed adequate characteristics for nail application and preserved the nanostructures while on nail permeation studies, presented higher percentage of tioconazole recovery from nail plate. Confocal microscopy analysis showed more than 30% of nail thickness in penetration depth of the fluorescent marker from the formulations. In an *ex vivo* onychomycosis model, the unguinal formulations showed equivalent activity compared to the commercial tioconazole formulation with tioconazole concentration of 280 times lower. In addition, the association of tioconazole to polymeric nanocapsules led to a reduction of the irritative potential of the drug *in vitro*.

Key words: Tioconazole. Lipid nanoparticles. Polymeric nanocapsules. Natural raw materials. Superficial mycosis. Skin penetration. Onychomycosis. Nail penetration.



## LISTA DE FIGURAS

### REVISÃO DE LITERATURA

- Figura 1- A) Unha humana, B) micrografia óptica da secção transversal da unha humana..... 37
- Figura 2- Estrutura química do tioconazol ..... 45

### CAPÍTULO 1: Nanopartículas lipídicas obtidas a partir de materiais naturais inovadores para liberação tópica de tioconazol

- Figura 1- Particle size distribution of (A) TIO-MGS and (B) TIO-TTO-MGS by Laser diffractrometry ..... 89
- Figura 2- TEM images of TIO-MGS (a) (150,000 x; bar = 200 nm) and TIO-TTO-MGS (b) (150,000 x; bar = 200 nm) ..... 90
- Figura 3- Release profile of tioconazole from MGS and TTO-MGS aqueous suspension using dialysis bag (n = 3). Data represent mean  $\pm$  SD (n=3)..... 91
- Figura 4- *In vitro* activity of free tioconazole and loaded-MGS and TTO-MGS against *C. albicans* (n = 6). \*Statistically different ( $p \leq 0.05$ )..... 92
- Figura 5- Skin penetration profiles of hydrogels containing free tioconazole (HG-TIO), and tioconazole loaded-Mangospheres (HG-TIO-MGS and HG-TIO-TTO-MGS) (n = 6). \*\*Statistically different ( $p \leq 0.05$ )..... 93

### CAPÍTULO 2: Desenvolvimento de nanocápsulas poliméricas de óleo de copaíba com revestimento catiônico para liberação cutânea de tioconazol

- Figura 1- Peso dos filmes poliméricos de PCL na presença de óleo de copaíba durante 30 dias..... 101
- Figura 2- Perfil de liberação do tioconazol a partir das TIO-NC<sub>COPA</sub> e TIO-R-NC<sub>COPA</sub> e solução (TIO-S) por um período de 30 h (n=3, média  $\pm$  DP)..... 114
- Figura 3- Valores de log UFC/mL para as suspensões de nanocápsulas (TIO-NC<sub>COPA</sub> e TIO-R-NC<sub>COPA</sub>), tioconazol em solução (TIO-S), nanocápsulas controle (sem o fármaco, NC<sub>COPA</sub> e R-NC<sub>COPA</sub>) e inóculo (IN), obtidos na avaliação da atividade antifúngica *in vitro* frente à *C. albicans* (n=3; média  $\pm$  EP)..... 116

Figura 4-	Potencial bioadesivo dos hidrogéis contendo tioconazol associado às nanocápsulas poliméricas revestidas (HG-TIO-R-NC <sub>COPA</sub> ) e hidrogéis contendo o fármaco não associado (HG-TIO) em modelo de escoamento de líquido (n=4). *Estatisticamente diferente ( $p \leq 0,05$ ).....	120
Figura 5-	Perfis de penetração do tioconazol a partir dos hidrogéis contendo tioconazol não associado (HG-TIO) e tioconazol associado às nanocápsulas revestidas (HG-TIO-R-NC) e não revestidas (HG-TIO-NC), nas diferentes camadas cutâneas (n=6, média $\pm$ EP). *Estatisticamente diferente ( $p \leq 0,05$ ).....	121

#### **CAPÍTULO 4: Desenvolvimento de nanocápsulas poliméricas de óleo de copaíba com revestimento catiônico para liberação cutânea de tioconazol**

Figura 1-	Imagens por MET de A) TIO-NC e B) TIO-R-NC. Ampliação em 150,000 x; barra = 100 nm).....	157
Figura 2-	Imagens por MEV da superfície dorsal da unha tratada com: 1) formulação ungueal-base (sem nanocápsulas) e 2) L-TIO-R-NC, em três diferentes ampliações: (a) 1.5K; (b) 5K e (c) 8K.....	160
Figura 3-	Perfil de liberação do tioconazol a partir das suspensões de nanocápsulas (TIO-NC, TIO-R-NC) e da solução (TIO-S) utilizando A) saco de diálise e B) membrana de silicone, por 72 h (n=3).....	161
Figura 4-	Perfis de liberação do tioconazol associado às nanoestruturas a partir das formulações ungueais (L-TIO-R-NC), do fármaco não associado (L-TIO) e da formulação comercial (Trosid <sup>®</sup> ) durante 72 h (n = 3).....	163
Figura 5-	Imagens ilustrativas das unhas seccionadas transversalmente: (1) imagens ópticas das unhas integrais tratadas; (2) imagens ópticas e imagens fluorescentes do NR mescladas; (3) fluorescência do NR após tratamento diário com: A) L-NR-R-NC; B) NR-R-NC; C) NR-NC; D) NR-S. Barra = 100 $\mu$ m. ....	168
Figura 6-	Imagens planares (x-y) de (A) placa da unha intacta e (B) placa da unha com microporos a $\sim$ 20 $\mu$ m de profundidade demonstrando a disposição do NR seguindo sete dias de experimento envolvendo aplicação diária de NR-S. Barra = 50 $\mu$ m.....	169

Figura 7- Modelo de onicomicose causada por *T. rubrum*. Fragmento de unha sem tratamento (A); tratamento com Trosid<sup>®</sup> (B); tratamento com a formulação ungueal (C); visão ventral de unha após tratamento com a formulação ungueal (D).....

## LISTA DE TABELAS

### **CAPÍTULO 1: Nanopartículas lipídicas obtidas a partir de materiais naturais inovadores para liberação tópica de tioconazol**

Tabela 1-	Physicochemical characteristics of tioconazole-loaded mangospheres (TIO-MGS, TIO-TTO-MGS) and blank mangospheres (MGS and TTO-MGS) (n=3, mean $\pm$ SD).....	88
-----------	--	----

### **CAPÍTULO 2: Desenvolvimento de nanocápsulas poliméricas de óleo de copaíba com revestimento catiônico para liberação cutânea de tioconazol**

Tabela 1-	Classificação do potencial de irritação de acordo com o índice de HET-CAM .....	107
Tabela 2-	Valores de pH, diâmetro médio de partícula, potencial zeta, índice de polidispersão (PDI) e teor de tioconazol nas suspensões de nanocápsulas revestidas e não-revestidas (média $\pm$ DP).....	111
Tabela 3-	Coefficiente de correlação ( $r$ ) e MSC referentes aos diferentes modelos matemáticos obtidos para a liberação do tioconazol a partir das suspensões de nanocápsulas (TIO-NC <sub>COPA</sub> e TIO-R-NC <sub>COPA</sub> ) (n = 3, média $\pm$ DP).....	114
Tabela 4-	Caracterização físico-química dos hidrogéis: pH, índice de fluxo ( $n$ ), índice de consistência ( $k$ ), fator de espalhabilidade (FE) e teor de fármaco dos hidrogéis contendo as suspensões poliméricas HG-TIO-NC e HG-TIO-R-NC (n=3, média $\pm$ DP).....	117

### **CAPÍTULO 3: Óleos essenciais para o tratamento tópico de oncomicoses: mini-revisão**

Tabela 1-	Minimal inhibitory concentration of essential oils for main etiological agents of onychomycosis: <i>C. albicans</i> , <i>T. mentagrophytes</i> and <i>T. rubrum</i> .....	128
-----------	---	-----

## **CAPÍTULO 4: Avaliação *in vitro* de formulações contendo nanocápsulas poliméricas como sistemas de liberação ungueal de tioconazol**

Tabela 1-	Classificação do potencial de irritação de acordo com o índice de HET-CAM.....	156
Tabela 2-	Características físico-químicas das formulações TIO-NC e TIO-R-NC (1 mg/mL) (n=3, média ± DP).....	158
Tabela 3-	Quantidade de tioconazol aplicada (TIOA) e quantidade de fármaco extraída por grama de unha (TIO/unha), utilizando células de Franz com aplicação única das formulações e células <i>in-line</i> com aplicação única e diária (média ± DP).....	164
Tabela 4-	Quantidade de tioconazol em sete dias de aplicação diária das formulações (TIOA <sub>7</sub> ), quantidade total de tioconazol recuperado da unha (TIO) e percentual de tioconazol recuperado (TIOR%) (n=3, média ± DP).....	165
Tabela 5-	Tabela 5. Quantidade de tioconazol aplicada (TIOA) e quantidade de fármaco extraída por grama de unha (TIO/unha), em células <i>in-line</i> com aplicação única e diária das formulações nas unhas microporadas (média ± DP).....	166
Tabela 6-	Profundidade de penetração (µm) na placa ungueal do NR após sete dias de exposição às formulações L-NR-R-NC, NR-R-NC, NR-NC e NR-S, seguindo aplicação única e diária em unhas íntegras, e diária em unhas microporadas (10 medições por corte transversal, n=3, média ± SD).....	167

### **DISCUSSÃO GERAL**

Tabela 1-	Composição quali-quantitativa das suspensões de nanocápsulas poliméricas sem revestimento catiônico para 10 ml de suspensão.....	186
-----------	--	-----



## SUMÁRIO

<b>INTRODUÇÃO</b> .....	25
<b>OBJETIVO</b> .....	31
2.1 OBJETIVO GERAL.....	31
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	31
<b>REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	
3.1 INFECÇÕES FÚNGICAS SUPERFICIAIS .....	35
<b>3.1.1 A Pele</b> .....	35
3.1.1.1 <i>A unha</i> .....	36
<b>3.1.2 Micoses superficiais: etiologia, evolução e tratamento</b> .....	37
3.1.2.1 <i>Onicomicoses</i> .....	40
3.2 TIOCONAZOL.....	45
3.3 MATÉRIAS-PRIMAS DE ORIGEM VEGETAL PARA O TRATAMENTO DE DESORDENS CUTÂNEAS.....	48
3.4 SISTEMAS NANOESTRUTURADOS .....	50
<b>3.4.1 Nanopartículas lipídicas</b> .....	52
<b>3.4.2 Nanopartículas poliméricas</b> .....	53
<b>3.4.3 Veiculação de antimicrobianos a sistemas nanoparticulados</b> .....	55
<b>3.4.4 Incorporação de nanopartículas em formas farmacêuticas de uso tópico.</b>	58
<b>CAPÍTULO 1: Nanopartículas lipídicas obtidas a partir de materiais naturais inovadores para a liberação tópica de tioconazol</b> .....	63
<b>CAPÍTULO 2: Desenvolvimento de nanocápsulas poliméricas de óleo de copaíba com revestimento catiônico para liberação cutânea de tioconazol</b> .....	97
<b>CAPÍTULO 3: Óleos essenciais para o tratamento tópico de onicomicoses: mini-revisão</b> .....	131
<b>CAPÍTULO 4: Avaliação <i>in vitro</i> de formulações contendo nanocápsulas poliméricas como sistemas de liberação ungueal de tioconazol</b> .....	141
<b>DISCUSSÃO GERAL</b> .....	179

<b>CONCLUSÃO.....</b>	<b>203</b>
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>207</b>

## **INTRODUÇÃO**

---



## 1. INTRODUÇÃO

A pele é o órgão responsável por fornecer barreiras mecânicas efetivas, protegendo o organismo contra agentes externos, sejam eles, infecciosos ou químicos (NOSKIN et al., 2005). Quando ocorrem injúrias, a área lesionada acaba tornando-se suscetível à contaminação por micro-organismos, que, dependendo da extensão da lesão e da carga microbiana, pode levar ao surgimento de abscessos cutâneos e, ainda, ao acometimento da circulação e à probabilidade de infecções generalizadas (NOSKIN et al., 2005).

Como substrato para os agentes etiológicos causadores das dermatofitoses, a queratina da pele, pelos e unhas é colonizada por fungos dos gêneros *Epidermophyton*, *Microsporum* e *Trichophyton*, bem como algumas leveduras como *Candida* spp. Estes agentes ocasionam a destruição da queratina e, somadas a uma resposta inflamatória, acabam por originar lesões características (SIDRIN; ROCHA, 2004). Também conhecidas como micoses superficiais, estas infecções fúngicas encontram-se entre as doenças infecciosas de maior incidência, o que as torna um sério problema de saúde pública (GARG et al., 2009).

Dentre as micoses superficiais destacam-se as onicomicoses. Estas infecções ocorrem devido à instalação e ao desenvolvimento dos fungos nas unhas. São infecções que apresentam uma baixa adesão dos pacientes ao tratamento, pois requerem terapia sistêmica longa, sendo acompanhadas de efeitos adversos, contraindicações e interações com outros fármacos, principalmente os de uso contínuo. Além disso, o sucesso da terapia esbarra no aumento da resistência microbiana aos antifúngicos de ação sistêmica, somado à carência de terapia tópica efetiva (SCHAR, 2007).

Os fármacos mais utilizados para o tratamento de micoses superficiais são os antifúngicos poliênicos, azólicos, alilaminas e benzilaminas (BRENNAN; LEYDEN, 1997; MILLIKAN, 2010). Cabe salientar que a terapia usual que apresenta menor incidência de efeitos adversos e interações medicamentosas consiste no tratamento tópico ou sistêmico a partir de derivados azólicos (HUANG et al., 2004). Todavia, estes agentes apresentam baixa biodisponibilidade oral pelo fato de serem altamente lipofílicos e, portanto, apresentam dissolução limitada nos fluidos do trato gastrointestinal, prejudicando a chegada ao tecido alvo. Levando em consideração a terapia tópica, existe a peculiaridade de a pele e as unhas apresentarem-se como barreiras, impermeáveis à diversas substâncias. A baixa permeabilidade de fármacos nestes tecidos limita a biodisponibilidade local e, conseqüentemente, a eficácia (KAUR; KAKKAR, 2010).

O tioconazol é um agente antifúngico imidazólico de amplo espectro de ação, possuindo atividade inibitória frente a leveduras e fungos, incluindo os filamentosos e os dermatófitos (JERVONS et al., 1979). É indicado para a terapia tópica de dermatofitoses, especialmente causadas na pele e nas unhas, e candidíase vaginal. (FROMTLING, 1988). Em contrapartida, o emprego de altas concentrações de tioconazol está associado ao surgimento de reações adversas, como dermatites de contato (STUBB et al., 1992).

A busca por terapias alternativas para o tratamento tópico de diversas lesões leva ao encontro de uma variedade de plantas medicinais, com as mais diversas propriedades terapêuticas. Os óleos essenciais ou fixos obtidos a partir dessas plantas têm sido amplamente utilizados, isolados ou incorporados em formulações farmacêuticas, com ou sem a utilização de adjuvantes ativos, no sentido de complementar a medicina convencional ou até mesmo substituí-la, principalmente no que diz respeito às terapias antifúngica e antibacteriana (BUCK; NIDORF; ADDINO, 1994; SYED et al., 1999; NASCIMENTO et al., 2007).

Neste sentido, dois óleos vegetais merecem atenção por suas propriedades medicinais. O óleo de copaíba (*Copaifera L.*) tem seu uso popular fundamentado na ação cicatrizante, anti-inflamatória e antisséptica (VEIGA JR.; PINTO, 2002; PIERI et al., 2009), incluindo ação frente a bactérias gram-positivas e fungos dermatófitos (SANTOS et al., 2008). Conhecido mundialmente por suas propriedades terapêuticas, o óleo essencial de *Melaleuca alternifolia* (óleo da árvore do chá ou *tea tree oil*) torna-se importante por sua ação antisséptica e comprovada eficácia no tratamento tópico de infecções fúngicas (CARSON; HAMMER; RILEY, 2006), além de apresentar atividade antibacteriana, especialmente frente ao *S. aureus*, incluindo sua cepa resistente à metilina (HALCÓN; MILKUS, 2004; CARSON; HAMMER; RILEY, 2006). Apresenta, também, atividade anti-inflamatória (HART et al., 2000) e cicatrizante (HALCÓN; MILKUS, 2004). Outra matéria prima vegetal que merece destaque neste contexto é a manteiga de manga (*Magnifera indica*), que apresenta atividades antimicrobiana (KABULI et al., 2000), antioxidante (SOONG; BARLOW, 2004; MAISUTHISAKIL; GORDON, 2009) cicatrizante, anti-inflamatória e umectante (MANDAWGADE; PATRAVALE, 2008a).

A eficácia de um agente antifúngico depende da concentração por ele alcançada no sítio de ação e fatores como a massa molecular, a concentração do fármaco, a rota de administração, a capacidade de penetração no tecido e o tempo de contato do antifúngico com o agente causador da infecção devem ser considerados. Diante disso, torna-se crescente a inserção de tecnologias que visam oportunizar estas características. Neste cenário, o desenvolvimento de formulações de liberação modificada e/ou controlada permite entregar

adequadamente o fármaco no local alvo, conferindo uma melhora da biodisponibilidade do mesmo (KAUR; KAKKAR, 2010).

A nanotecnologia, através de suas estruturas de reduzido tamanho ( $< 1 \mu\text{m}$ ) confere vantagens terapêuticas e farmacotécnicas. Com isso, proporciona uma maior e melhor distribuição da substância ativa no local de ação e o direcionamento deste ao seu sítio específico (GUTERRES; ALVES; POHLMANN, 2007; BECK; GUTERRES; POHLMANN, 2011). Estes sistemas promovem um aumento no tempo de permanência e adesividade do mesmo, o que apresenta potencialidade em sua aplicação tópica, tratando-se de locais em constante fricção por vestimentas e pelas simples atividades cotidianas (GUTERRES; ALVES; POHLMANN, 2007; MÜLLER et al., 2007; BECK; GUTERRES; POHLMANN, 2011). Além disso, a associação de antimicrobianos a sistemas nanoestruturados confere uma melhora na ação terapêutica, permitindo redução da frequência de administração (AMARAL et al., 2009) e aumento da eficácia (AHMAD et al., 2008; FLORES et al., 2013). Entretanto, sua forma original restringe a aplicação tópica, uma vez que a permanência destas no local de aplicação é dificultada por se tratarem de formas líquidas, sendo necessária a incorporação das suspensões/dispersões coloidais em veículos mais adequados às peculiaridades do local de aplicação, como preparações semissólidas para aplicação na pele e formulações do tipo esmalte para aplicação ungueal, o que possibilita um aumento no tempo de permanência da forma farmacêutica no local.

Considerando as potencialidades dos sistemas nanoestruturados em aumentar a eficácia de determinadas substâncias e contornar algumas dificuldades farmacotécnicas, este trabalho foi delineado no sentido de desenvolver formulações inovadoras de base nanotecnológica, contendo substâncias de origem natural e sintética, consistindo em uma estratégia para melhorar o tratamento tópico de infecções fúngicas.

Para uma melhor compreensão do presente trabalho, inicialmente será apresentada uma revisão de literatura, e a parte experimental dividida em capítulos. A primeira parte do trabalho (capítulos 1 e 2) destinou-se ao desenvolvimento de formulações para o tratamento tópico de micoses de pele e segunda parte deteve-se ao tratamento de onicomicoses, descrita nos capítulos 3 e 4. Assim, o Capítulo 1 (artigo submetido ao periódico *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*) trata do desenvolvimento de nanopartículas lipídicas e carreadores lipídicos nanoestruturados, denominadas de Mangoesferas, preparadas com o óleo de melaleuca e a manteiga de manga para a liberação do tioconazol. O Capítulo 2 compreende o desenvolvimento de nanocápsulas poliméricas contendo o óleo de copaíba e posterior revestimento catiônico das nanopartículas para a liberação cutânea de tioconazol. O Capítulo

3 (artigo publicado na revista *Mycopathologia*) constituiu uma revisão da literatura sobre a utilização de óleos essenciais no tratamento de onicomicoses nos últimos dez anos. Por fim, o capítulo 4 contemplou o desenvolvimento de sistemas nanoestruturados poliméricos revestidos e não revestidos com polímero catiônico contendo como núcleo oleoso triglicerídeos de cadeia média, e seu emprego no desenvolvimento de uma formulação ungueal visando o tratamento específico de onicomicoses. Ainda, será apresentada a discussão geral dos resultados envolvendo os quatro capítulos, seguida da conclusão.

**OBJETIVO**

---



## 2 OBJETIVO

### 2.1 OBJETIVO GERAL

O presente trabalho teve por objetivo geral desenvolver formulações dermatológicas inovadoras, de base nanotecnológica, utilizando lipídeos de origem vegetal ou sintética, e tioconazol como fármaco, visando sua aplicação no tratamento tópico de micoses superficiais de pele e de unhas.

### 2.2 Objetivos específicos

- Estudar a viabilidade tecnológica de obtenção de nanopartículas lipídicas sólidas e carreadores lipídicos nanoestruturados contendo tioconazol, utilizando a manteiga de manga como lipídeo sólido e o óleo de melaleuca, avaliando suas características físico-químicas, estabilidade e liberação *in vitro*;
- Desenvolver nanocápsulas poliméricas contendo tioconazol revestidas com quitosana e sem revestimento, utilizando o óleo de copaíba como núcleo oleoso dos nanocarreadores poliméricos propostos;
- Analisar a capacidade bioadesiva das suspensões de nanocápsulas revestidas com quitosana e sua atividade antifúngica frente à levedura de *Candida albicans*;
- Desenvolver formas farmacêuticas semissólidas (hidrogéis) contendo o fármaco de escolha associado às nanopartículas lipídicas e poliméricas, considerando as propriedades adequadas para aplicação tópica;
- Avaliar a permeação/penetração cutânea *in vitro* das formulações semissólidas desenvolvidas;
- Desenvolver nanocápsulas poliméricas contendo triglicerídeos de cadeia média (TCM) como núcleo, revestidas com quitosana e sua utilização no desenvolvimento de formulações líquidas ungueais;
- Investigar a capacidade de penetração/permeação ungueal do tioconazol a partir das nanocápsulas de TCM e da formulação líquida ungueal;
- Avaliar a eficácia da formulação ungueal em modelo de onicomicose causada pelo *Trichophyton rubrum*, e comparar com a formulação comercial para unhas contendo tioconazol, Trosid®.



**REVISÃO DA LITERATURA**

---



### 3 REVISÃO DA LITERATURA

#### 3.1 INFECÇÕES FÚNGICAS SUPERFICIAIS

##### 3.1.1 A pele

A pele, interface entre o corpo e o meio externo, é uma barreira biológica imprescindível na proteção do organismo frente a traumas, desidratação e agentes externos como substâncias químicas e micro-organismos (RAMOS-E-SILVA; CASTRO, 2010; CEVC; VIERL, 2010), constituindo uma barreira física, mecânica, química e imunológica. Este órgão ainda tem importante participação na regulação da temperatura corporal e é através dele que é realizada a excreção e a absorção de substâncias, além de desempenhar funções sensoriais e autonômicas. É constituída por um epitélio estratificado superficial, chamado de epiderme, uma camada vascularizada, a derme e, por fim, uma camada mais profunda de tecido gorduroso, denominada hipoderme (RAMOS-E-SILVA; CASTRO, 2010).

A camada mais superficial da pele, a epiderme, é uma camada avascular, composta por quatro tipos diferentes de células: queratinócitos, células de Langerhans, células de Merkel e melanócitos (RAMOS-E-SILVA; CASTRO, 2010). Os queratinócitos, obtidos através da síntese da queratina, dão origem ao estrato córneo (camada córnea), a camada mais externa da epiderme, sendo esta predominantemente responsável pela função de barreira. Possui células anucleadas, coesas e perfeitamente justapostas, unidas por desmossomos. Os corpos lamelares e os lipídeos que preenchem o espaço intercorneócito da camada córnea são essenciais para a função de barreira protetora (CEVC; VIERL, 2010; SCHREML et al., 2010; RAWLINGS, 2010). Em função disso, a conservação da composição lipídica no espaço intercelular é crucial para a manutenção da integridade cutânea, o que pode ser afetada pela perda de água, solubilização e posterior remoção da sua composição lipídica. Além disso, a homeostase da barreira epidérmica e a integridade do estrato córneo são influenciadas por alterações no pH local (SCHREML et al., 2010). A ocorrência de lesões nesta camada torna a pele suscetível à invasão por agentes microbianos, com formação de abscessos cutâneos e, em casos mais severos, o surgimento de infecções generalizadas (NOSKIN et al., 2005).

As células de Langerhans, presentes na camada suprabasal da epiderme viável, são células móveis, responsáveis por captar e apresentar antígenos aos linfócitos. Depois de repetidas ocorrências de dermatites de contato, a contagem destas células encontra-se

aumentada. As células de Merkel localizam-se na camada basal e nos folículos pilossebáceos, são responsáveis pelo tato e apresentam função mecanorreceptora, além de possuírem características epiteliais e neuroendócrinas. Já os melanócitos são células sintetizadoras de melanina, pigmento que dá cor à pele e é responsável por proteger este órgão dos danos causados pelos raios ultravioleta, absorvendo a radiação (RAMOS-E-SILVA; CASTRO, 2010).

A derme é uma camada vascularizada, localizada abaixo da epiderme e constituída predominantemente de colágeno (cerca de 70%) e poucas células (em sua maioria fibroblastos, adipócitos e algumas imunologicamente ativas). É uma camada elástica e flexível, inervada e regada por vasos linfáticos e sanguíneos (CEVC; VIERL; 2010; RAMOS-E-SILVA; CASTRO, 2010). Mais abaixo se localiza a hipoderme, camada formada por células compostas quase que exclusivamente de triglicérides e ácidos graxos, os adipócitos, que dão origem a um tecido gorduroso, localizado na região mais interna e profunda da pele, atuando como reservatório de nutrientes. Desempenha importante função na termorregulação, além de proteger de traumas mecânicos (RAMOS-E-SILVA; CASTRO, 2010).

A partir da epiderme derivam os anexos ou apêndices cutâneos: as glândulas, os folículos pilossebáceos e as unhas. As glândulas sebáceas são glândulas holócrinas e secretam o sebo, que confere à superfície da pele uma película sebosa hidrofóbica. Já as glândulas sudoríparas são exócrinas e tem papel importante na termorregulação. Os folículos pilossebáceos produzem os pêlos, exercem função na termorregulação e, ainda, são o nicho de diferentes linhagens celulares cutâneas (RAMOS-E-SILVA; CASTRO, 2010).

### *3.1.1.1 A unha*

A unha desempenha funções de proteção e é responsável por gerar sensação de toque e firmeza ao segurar objetos, além de ter um papel de destaque na indústria cosmética (MURDAN, 2002; MURTHY; MAIBACH, 2013). É uma estrutura endurecida, composta de pregas (invaginações de pele em forma de cunha), placa ungueal, que origina a matriz da unha (tecido epidérmico altamente proliferativo) e abrange todo o leito ungueal (fina camada epitelial, com tecido conjuntivo intensamente vascularizado) e hiponíquio (tecido epidérmico com terminações nervosas) (RAMOS-E-SILVA; CASTRO, 2010) (Figura 1A).

A placa da unha é uma fina, não homogênea, elástica e translúcida chapa de moléculas de queratina ligadas por pontes dissulfeto e baixa concentração lipídica (ELKEEB et al., 2010; SHIVAKUMAR et al., 2011). A parte dorsal corresponde a cerca de 30% da espessura

da placa da unha e tem aparência lisa, onde os filamentos de queratina estão justapostos em “sanduíche”, colados pelas proteínas globulares (responsáveis pela adesividade entre as células), o que confere rigidez e função de barreira a agentes estranhos (MURDAN, 2002; MURTHY; MAIBACH, 2013). A camada intermediária corresponde a cerca do dobro da espessura dorsal e corresponde à massa principal da unha. É composta por queratina menos resistente, originando uma camada mais porosa e permeável. Já a camada ventral é composta de hiponíquio mole e conecta a placa da unha ao leito ungueal, e exhibe uma superfície irregular, sendo mais suscetível à permeação de substâncias (DEBRUYNE; COQUEREL, 2013) (Figura 1B).

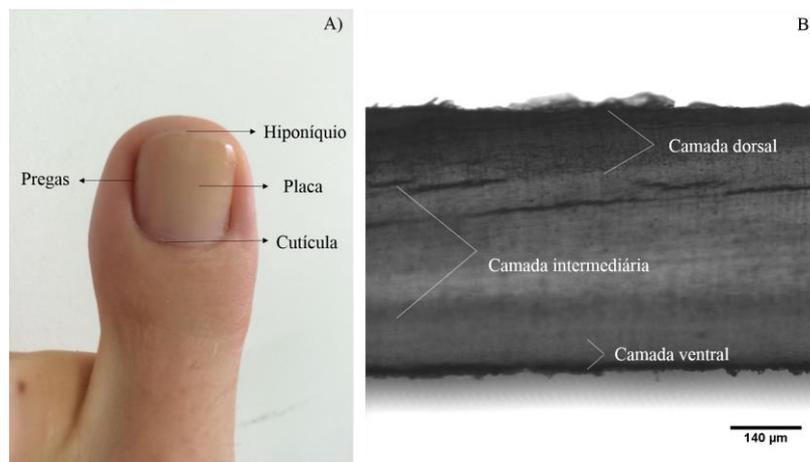


Figura 1. A) Unha humana, B) micrografia óptica da secção transversal da unha humana.

### 3.1.2 Micoses superficiais: etiologia, evolução e tratamento

As infecções fúngicas superficiais, micoses superficiais, tineas (*tinea capitis*, *tinea corporis*, *tinea pedis*, *tinea cruris*, entre outras) ou dermatofitoses, como também são conhecidas, acometem homens e animais e encontram-se dentre as doenças infecciosas de maior prevalência (SIDRIM; ROCHA, 2004). Sua distribuição é universal e a localização das lesões varia de acordo com a idade e o sexo do paciente, e conforme a espécie do agente etiológico envolvido (RAMOS-E-SILVA; CASTRO, 2010). Segundo Lacaz e colaboradores (2002), as micoses superficiais podem ser classificadas como: (1) candidíases (podendo ser causadas por outras leveduras), (2) dermatofitoses superficiais (tineas), (3) dermatomicoses causadas por outros fungos não-dermatófitos, (4) onicomicoses, (5) otomicoses, (6) piedra branca, (7) piedra preta, (8) pitiríase versicolor e (9) tinea nigra. Todavia, o foco desta revisão seguirá somente as infecções causadas por espécies de *Candida* e fungos dermatófitos.

Estas infecções fúngicas são causadas, principalmente, por fungos filamentosos pertencentes aos gêneros *Epidermophyton*, *Microsporum* e *Trichophyton* (MARTINEZ-ROSSI; PERES; ROSSI, 2008; MINGNON et al., 2008) e leveduras como *Candida* spp. Dentre os agentes acima citados, causadores de micoses superficiais, ganham destaque os dermatófitos, devido à frequência com que são isolados das lesões. As diferentes espécies identificadas demonstram que algumas são antropofílicas, outras geofílicas, ou então, zoofílicas (LACAZ et al., 2002). Assim, a identificação dos fungos tem grande importância epidemiológica no controle das infecções, uma vez que evidencia a fonte de contaminação (homem, solo ou animais domésticos) (RAMOS-E-SILVA; CASTRO, 2010). Espécies de *Candida* que habitam a pele e as mucosas inócua e comensalmente, por vezes incitam infecções oportunistas, que podem variar de lesões superficiais menos severas para condições sistêmicas preocupantes, dependendo da debilidade do sistema imune do hospedeiro (JAYATILAKE; TILAKARATNE; PANAGODA, 2009). Entretanto, muitas vezes o diagnóstico, de difícil elucidação, não é satisfatório, e se faz necessária a utilização de técnicas onerosas e demoradas, como o sequenciamento genético (KANBE, 2008).

Estes fungos altamente especializados são capazes de invadir e digerir a queratina, através da produção de queratinases (MARTINEZ-ROSSI; PERES; ROSSI, 2008). Desse modo, os tecidos acometidos por tais infecções são especialmente os tecidos de maior concentração queratínica, como pele, unhas, pêlos e cabelo (GUPTA; CHAUDHRY; ELEWSKI, 2003; SIDRIM; ROCHA, 2004; KANBE, 2008). Devido à inabilidade desses agentes atingirem tecidos mais profundos e, principalmente, por serem áreas “seguras”, obstatas da circulação, e, portanto, da reação do sistema imunológico do hospedeiro, as dermatofitoses ocorrem em sua maioria em tecidos com baixa vascularização ou mesmo tecidos mortos (KANBE, 2008).

Ao invadir a compacta camada proteica que compõe os tecidos queratinizados, os fungos dermatófitos primeiramente secretam as exoproteases (aminopeptidases e dipeptil-peptidases) responsáveis pela sulfitólise da queratina, tornando-a acessível às endoproteases, que são secretadas em seguida, responsáveis pela sua digestão (MINGNON et al., 2008; VERMOUT et al., 2008). A elevada virulência destes agentes é atribuída às proteínas queratolíticas, somada à ação das glicoproteínas, por eles, também secretadas, que conferem capacidade de aderência ao substrato. Estes fatores são expressos durante todo o processo inflamatório, modulando, assim, a resposta imunológica do hospedeiro (MARTINEZ-ROSSI; PERES; ROSSI, 2008). Da mesma forma, *C. albicans* é capaz de secretar proteínases, sendo que a de maior importância é a SAP (Aspartil-Protease Secretada), que além de digerir a

queratina, também é ativa na degradação do colágeno, sendo responsável pela virulência desta levedura (LACAZ et al., 2002).

As proteínas queratolíticas (Sub3 e Mep3) são produzidas *in vivo* e pertencem a família de proteínas encontradas em diversas espécies de dermatófitos. São altamente imunogênicas e, independentemente da localização do processo infeccioso, são capazes de induzir respostas imunológicas específicas, com componentes humorais e celulares (MIGNON et al., 2008). As reações inflamatórias geradas frente aos agentes etiológicos estão relacionadas à expressão de genes diferenciais que codificam a secreção das enzimas (MARTINEZ-ROSSI; PERES; ROSSI, 2008; MIGNON et al., 2008; VERMOUT et al., 2008) e variam de acordo com a espécie fúngica e o estado fisiopatológico do hospedeiro. Entretanto, alguns dermatófitos são capazes de se adaptar e invadir silenciosamente, sem ativar o sistema imune, ocasionando dermatofitoses crônicas (VERMOUT et al., 2008).

As lesões cutâneas geradas nesse tipo de infecção normalmente são resultado da destruição da queratina, acompanhada pela resposta inflamatória (SIDRIM; ROCHA, 2004). As manifestações clínicas mais comuns são na forma de placas eritematosas, com descamação, podendo ocorrer nódulos ou vesículas espalhadas pela área infectada. Frequentemente há prurido e, no caso de infecções recorrentes ou maceração da área da lesão, a dor acompanha os sintomas (GUPTA; CHAUDHRY; ELEWSKI, 2003). Em pacientes imunocomprometidos ou com diabetes descompensada, a infecção superficial tende a evoluir para infecções cutâneas e subcutâneas mais profundas (KENBE, 2008). As escamas de pele liberadas durante o processo de renovação celular são infestadas por artroconídeos, responsáveis pela transferência da infecção. Uma vez infectado, o indivíduo pode transmitir o elemento fúngico através destas escamas, por contato direto ou por objetos contendo as escamas infectadas (GUPTA; CHAUDHRY; ELEWSKI, 2003). Ainda, estes fungos são capazes de despertar a liberação de alérgenos circulantes que, em pessoas sensíveis, ocasionam manifestações cutâneas distantes do foco primário (LACAZ et al., 2002).

A terapia empregada nos casos de micoses superficiais, em sua maioria, é de aplicação tópica, tendo como fármacos normalmente eleitos os derivados azólicos, alilaminas, derivados benzilamínicos e hidroxipirrolidonas. Entretanto, quando há o acometimento de grandes áreas, cronicidade ou recorrência, ou ainda, quando se faz necessária a reaplicação do medicamento, a utilização de terapia sistêmica é requerida e melhor aceita (GUPTA; CHAUDHRY; ELEWSKI, 2003). Cabe salientar que a terapia sistêmica antifúngica tem o risco de interações com outros medicamentos de uso contínuo (metabolização via citocromo P450), contraindicações, surgimento de efeitos adversos, além de alguns fármacos apresentarem

toxicidade hepática e sanguínea, necessitando, na maioria das vezes, acompanhamento clínico (MURDAN, 2002; GUPTA; CHAUDHRY; ELEWSKI, 2003). Além disso, os microorganismos podem se tornar resistentes à terapia empregada (EVANS; ROBERTS, 1998), através de modificações de enzimas-alvo, desenvolvimento de bombas de efluxo e respostas celulares de proteção desenvolvidas quando doses subinibitórias de fármaco são administradas (MARTINEZ-ROSSI; PERES; ROSSI, 2008). Outro fator que contribui para o desenvolvimento de resistência é a interrupção do tratamento sem a exterminação do agente, levando a um aumento na formação de artroconídeos (COELHO et al., 2008), que ocorre a partir da fragmentação das hifas dos fungos filamentosos e consiste em um elemento fúngico resistente, tanto às intempéries do meio quanto aos quimioterápicos (YAZDANPARAST; BARTON, 2006; FINCH; WARCHAW, 2007).

### 3.1.2.1 Onicomicoses

As infecções de unhas ocasionadas por fungos são responsáveis por mais de 50% das doenças que acometem este apêndice e são as infecções fúngicas superficiais de maior relevância (BARAN; KAOUKHOV, 2005). Cerca de 20% das pessoas com idade entre 40 e 60 anos apresentam algum tipo de onicomicose (JAYATILAKE; TILAKARATNE; PANAGODA, 2009). Tais infecções acometem as unhas das mãos e dos pés (em sua grande maioria, o primeiro dedo do pé por ter um crescimento mais longo e estar mais frequentemente exposto a traumas e patógenos) (BARAN; KAOUKHOV, 2005; EFFENDY et al., 2005), as quais se apresentam quebradiças, finas, discrômicas e desfiguradas (GUNT; KASTING, 2007). Consiste em um problema que merece atenção, pois reconhecidamente os casos descompensados têm o potencial de acarretar sérias complicações como, por exemplo, ulcerações de pés e pernas, com casos de amputações do membro afetado (GUPTA; TU, 2006).

Os agentes etiológicos causadores das infecções ungueais são os fungos dermatófitos, fungos não-dermatófitos e espécies de *Candida* (SIDRIN; ROCHA, 2004; BARAN; KAOUKHOV, 2005; EFFENDY et al., 2005). A transmissão se dá a partir de superfícies úmidas contaminadas, trocador, água, roupas sujas e, menos frequentemente, por contato direto (LACAZ et al., 2002; EFFENDY et al., 2005), sendo que infecções por *T. rubrum* são exclusivamente transmitidas entre humanos (KANBE, 2008). Fatores como idade avançada, sexo masculino, questões genéticas, diabetes, imunodeficiência, doença arterial periférica e

psoríase, predisõem o surgimento destas infecções (BARAN; KAOUKHOV, 2005; EFFENDY et al., 2005).

A maioria das onicomicoses é causada por dermatófitos pertencentes aos gêneros *Trichophyton*, *Microsporum*, e *Epidermophyton*, sendo que as principais espécies, mais frequentemente isoladas são: *T. rubrum* (60 % dos casos), *T. mentagrophytes* (cerca de 20%), e *E. floccosum* (10%), o restante sendo oriundo de invasões por fungos e leveduras, em especial *Candida* spp. (EFFENDY et al., 2005; WELSH; VERA-CABRERA; WELSH, 2010). A instalação dos fungos dermatófitos nas unhas ocorre após a penetração dos mesmos na camada córnea (porção distal) do leito ungueal. A cinética de aderência de espécies de *Trichophyton* e *Microsporum* nos tecidos-alvo constitui uma relação tempo-dependente com o aumento de esporos aderentes, que germinam, transformando-se em hifas que invadem o estrato córneo ou as placas de queratina em múltiplas direções (VERMOUT et al., 2008). Lesões ocasionadas por traumas predisõem à penetração do agente na unha (BARAN; KAOUKHOV, 2005; EFFENDY et al., 2005; VERMOUT et al., 2008).

A invasão do tecido ungueal por leveduras (*Candida* spp.) origina-se a partir das bordas ungueais, resultando em inflamação dos capilares e em seguida, há o acometimento do leito ungueal (paroníquia) (HAY; BARAN, 2011), podendo também resultar em onicolise (mais frequentemente nas unhas das mãos) e granulomas (em pacientes com candidíase mucocutânea crônica). Estas leveduras podem ser agentes patogénicos primários (frequentemente em casos de imunossupressão), ou secundários (traumas locais, más condições de higiene, doença vascular periférica, má-nutrição) (JAYATILAKE; TILAKARATNE; PANAGODA, 2009).

As micoses ungueais são classificadas em função dos sinais clínicos e das alterações estruturais oriundas das infecções pelas diferentes espécies. Hay e Baran (2011) elaboraram uma classificação completa e atual destas infecções: *onicomicose subungueal distal e lateral* (hiperqueratose com intervalo de discromias e listras longitudinais no meio ou nas laterais da placa ungueal) que segundo Effendy e colaboradores (2005), é o tipo mais comum; *onicomicoses superficiais* (irregulares ou transversais, a invasão para camadas mais profundas também pode ser observada); *onicomicose endonyx* (acometimento de camadas profundas da placa ungueal); *onicomicose subungueal proximal* (normalmente secundária à paroníquia, origina lesões desiguais e estriadas); *onicomicose totalmente distrófica* (há total alteração da placa ungueal, ocorre secundariamente a estados avançados de outras invasões da placa ungueal, frequentemente associada com casos de imunocomprometimento); *onicomicose secundária* (decorrente de outras patologias de unha).

Ter unhas bem cuidadas, limpas e saudáveis desempenha um importante papel na imagem perante a sociedade. Unhas distróficas, com a aparência prejudicada podem se tornar um empecilho na inclusão social, podendo ocasionar problemas relacionados à autoestima. Além disso, unhas anormais prejudicam o desempenho em utilizar as mãos e dedos e podem causar dor ao caminhar, comprometendo a qualidade de vida, tanto de homens, quanto de mulheres (DRAKE et al., 1996; DRAKE et al., 1999). A ocorrência deste tipo de infecção se agrava pela dificuldade de tratamento e, muitas vezes, quando há envolvimento de várias unhas ou, quando a superfície infectada é grande, é considerada uma doença intratável (GUPTA; SCHER; DONCKER, 1997), o que somado à frequência que se apresenta na prática, torna-se uma doença de grande importância clínica (LACAZ et al., 2002).

O tratamento destas infecções inclui administração oral e/ou tópica de antifúngicos e, em alguns casos, remoção cirúrgica ou química (NUNLEY; CORNELIUS, 2008; ELKEEB et al., 2010). A terapêutica deve levar em consideração o agente causador e a sintomatologia clínica, como a permanência e a extensão das lesões (WELSH; VERA-CABRERA; WELSH, 2010), assim como a eficácia do fármaco, a ocorrência de efeitos adversos, a posologia, a adesão ao tratamento por parte dos pacientes, o custo e a durabilidade (GUPTA; SCHER; DONCKER, 1997). Ainda, a escolha do melhor agente antifúngico deve levar em consideração propriedades que afetam a sua permeabilidade na unha, bem como a atividade antifúngica. Características como baixo peso molecular, afinidade pela queratina, baixa lipofilicidade, grau de ionização do antifúngico e pH da formulação são de suma importância para que o antifúngico permaneça em tempo adequado e consiga o mínimo de penetração na placa ungueal (ELSAYED, 2015). É importante salientar que mesmo após um tratamento satisfatório, a aparência da unha nem sempre volta ao normal (SHER et al., 2007).

Todavia, a escolha do melhor tipo de terapia acaba se tornando um desafio, uma vez que a terapia sistêmica está relacionada à ocorrência de inúmeros efeitos adversos, contraindicações, interações medicamentosas, além de alguns fármacos apresentarem toxicidade importante, fazendo necessário, na maioria das vezes, um acompanhamento da função hepática e contagem das células sanguíneas (LESHER, 1996; MURDAN, 2002; NUNLEY; CORNELIUS, 2008). O somatório destes eventos acaba implicando em um seguimento terapêutico inadequado, por vezes associado ao abandono do tratamento (SIDRIM; ROCHA, 2004). Ainda, não há uma relação direta da concentração plasmática dos antifúngicos com os níveis alcançados na unha e, na maioria dos casos, pouco se sabe sobre a farmacocinética destes no tecido ungueal (GUPTA; SCHER; DONCKER, 1997; ELSAYED, 2015). Os principais fármacos utilizados no tratamento sistêmico de onicomicoses são:

terbinafina, itraconazol, fluconazol e griseofulvina (LACAZ et al., 2002; MILLIKAN, 2010; MURTHY; MAIBACH, 2013). Assim, essa acaba sendo a via de escolha devido à baixa taxa de cura da terapia tópica, ainda que cerca de 20% dos pacientes não respondam a essa via de tratamento (MURTHY; MAIBACH, 2013).

A remoção cirúrgica ou química da unha infectada muitas vezes é a opção devido a falhas no tratamento e recidivas, no intuito de remover todo o tecido infectado, bem como qualquer elemento fúngico remanescente. No entanto, há a necessidade de utilização de uma unha postiça para que se mantenha a largura do leito ungueal para a unha que crescerá posteriormente. Além disso, a probabilidade de a unha encravar é alta. Não obstante, incontestavelmente, se faz necessária a utilização de antifúngico tópico ou oral após a avulsão ungueal (GUPTA; TU, 2006).

Neste sentido, a terapia tópica é uma opção de tratamento, por ser uma terapia não invasiva e que disponibiliza a substância ativa exclusivamente no local da infecção, evitando a ocorrência de efeitos adversos e o risco de interação com medicamentos e elementos da dieta, além de possuir um menor custo (ALBERT; WEIS, 2004; MURDAN, 2002). Sobretudo, esta via é indicada para os casos iniciais ou menos severos de onicomicose, como adjuvante da terapia sistêmica (MURDAN, 2002); como monoterapia, somente em casos em que não há o comprometimento da matriz ungueal (GUPTA; SCHER; DONCKER, 1997), ou quando a terapia sistêmica não é recomendada, como em casos de gravidez e insuficiência hepática (MURTHY; MAIBACH, 2013). A restrição em relação à sua utilização se deve à baixa permeabilidade de substâncias através da compacta e dura placa de queratina da unha (MURDAN, 2002; BARAN; KAOUKHOV, 2005; ELSAYED et al., 2015), o que constitui um obstáculo ao acesso do fármaco aos elementos fúngicos (hifas e artroconídeos) localizados no seu interior, entrelaçados nas fibras queratínicas ou entre a placa e o leito ungueal (NAKASHIMA et al., 2002). Não obstante, as formulações tópicas convencionais são facilmente removidas na fricção com as vestimentas, ou nos procedimentos de limpeza (GUPTA; TU, 2006). O tratamento de escolha pra onicomicoses é administração oral de terbinafina, entretanto, itraconazol ou fluconazol oral também são considerados (MURTHY; MAIBACH, 2013). As formulações de uso tópico mais frequentemente empregadas no tratamento de tais desordens são: esmalte de amorolfina a 5%, esmalte de ciclopirox a 8%, creme de bifonazol a 1%, solução tópica, creme e gel de terbinafina a 1%, e solução de tioconazol a 28% (GROVER; KHURANA, 2012). O mercado relativo às onicomicoses dermatofíticas, em 2010 chegou à U\$\$ 2,1 bilhões, e o recente reconhecimento de que a penetração de substâncias através da placa ungueal é possível, embora difícil, impulsiona cada

vez mais as grandes empresas e pesquisadores em desenvolver formulações mais seguras e efetivas para o tratamento tópico de tais infecções (ELSAYED et al., 2015).

Para que haja sucesso na terapia tópica de onicomicoses é imprescindível que o antifúngico alcance o sítio da infecção e, portanto, as hifas e artroconídeos em concentrações suficientes e efetivas (KAUR; KAKKAR, 2010). Para tanto, é necessário que a apresentação farmacêutica permita que a substância ativa permaneça o tempo necessário na superfície da placa ungueal para que possa penetrar através da unha, atingindo os elementos fúngicos (REPKA; MIDIDODDI; STODGHILL, 2004). Sabe-se que muitos fatores influenciam o transporte de fármacos através da unha, como as características físico-químicas da substância, a natureza do veículo a ser utilizado, o estado de hidratação da unha (ELKEEB et al., 2010), bem como o tamanho de partícula e as características hidrofílicas ou lipofílicas da formulação (MURDAN 2002; KOBAYASHI et al., 2004; ELSAYED et al., 2015).

Assim, para contornar os obstáculos apresentados, se faz necessário o aperfeiçoamento da terapia tópica, desfrutando de tecnologias que viabilizem a entrega e o alcance da substância ativa, em concentrações adequadas ao elemento fúngico causador da infecção. Neste sentido, a utilização de promotores de penetração, como substâncias que rompam as pontes dissulfeto das fibras de queratina (n-acetil-cisteína, 2-mercaptoetanol), substâncias queratolíticas (uréia, ácido salicílico) e técnicas como iontoforese são estudadas (MURTHY; MAIBACH, 2013). Outra plataforma que tem sido avaliada a fim de melhorar a penetração através da unha é a utilização de sistemas coloidais. Estes sistemas, embora não-aptos a atravessar a placa ungueal, podem melhorar a penetração transungueal por proporcionarem liberação controlada e lenta do fármaco ou utilizando a pele periungueal para a liberação da substância ativa, que por sua vez irá difundir lateralmente até encontrar o leito ungueal (ELSAYED et al., 2015).

O emprego de esmaltes de unha na terapia antifúngica, quando insolúveis em água, inibem a adesão de novos esporos na unha, prevenindo a reinfecção nos estágios mais iniciais, ocluem o local e favorecem a hidratação da unha; entretanto, requerem a remoção com solventes orgânicos, o que prejudica a pele periungueal (ELSAYED et al., 2015). Além disso, por serem rapidamente evaporados, favorecem à formação de cristais de fármaco, incapazes de particionar e difundir através da placa da unha (GUPTA; TU, 2006). Já os esmaltes contendo formadores de filme solúveis em água garantem forte adesão à unha e facilitam a partição/liberação da substância ativa na unha e apresentam a vantagem de serem removidos com água, dispensando solventes orgânicos (MONTI et al., 2005; ELSAYED et al., 2015).

### 3.2 TIOCONAZOL

O tioconazol (Figura 2) é um agente antifúngico imidazólico originalmente sintetizado pela Pfizer U.K. (Sandwich, Inglaterra). Altamente lipossolúvel, apresenta coeficiente de partição de 5,3, peso molecular de 387,7 g/mol, e pKa de 6,5, sendo portanto uma base fraca (JERVONS, 1979). Seu espectro de ação é amplo, possuindo atividade inibitória frente a leveduras, fungos, incluindo os filamentosos e dermatófitos (JERVONS et al., 1979). Apresenta, ainda, atividade frente à clamídias, tricomonas e bactérias gram-positivas (FROMTLING, 1988). É indicado para a terapia tópica de dermatofitoses, especialmente aquelas que acometem pele e unha e candidíase vaginal (FROMTLING, 1988); demonstrou-se eficaz frente à infecções bacterianas (gram-positivas) secundárias à micoses (MUÑOZ et al., 2010).

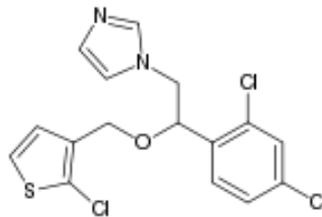


Figura 2. Estrutura química do tioconazol.

O mecanismo de ação deste imidazólico consiste na inibição da 14- $\alpha$ -esterol desmetilase, o que impede a síntese do ergosterol e faz com que haja um acúmulo de 14- $\alpha$ -metilesteróis, comprometendo as funções enzimáticas relacionadas à membrana fúngica, levando à inibição do crescimento (GOODMAN; GILMAN, 2006), caracterizando sua ação fungistática. Além disso, possui ação fungicida, por causar dano direto à membrana celular dos micro-organismos sensíveis (FROMTLING, 1988), independentemente do estágio de crescimento do fungo (diferindo de outros imidazólicos). Sua atividade antifúngica *in vitro* contra dermatófitos, leveduras e bactérias é igual ou superior aos demais imidazólicos, tais como miconazol, bifonazol e clotrimazol (ODDS; WEBSTER; ABBOTT, 1984). Em estudo realizado por Jervons e colaboradores (1979), as concentrações inibitórias mínimas (CIM) de tioconazol frente a espécies de *Candida*, *Trichophyton*, *Microsporum* e *Cryptococcus neoformans* foram inferiores às encontradas para o miconazol. Os valores de CIM do tioconazol variam de 0,2 - 25  $\mu\text{g/mL}$  para dermatófitos e 0,2 - 12,5  $\mu\text{g/mL}$  para *Candida albicans*.

Devido ao seu amplo espectro de ação antifúngica, o tioconazol é indicado para o tratamento das mais variadas afecções causadas por fungos. Para o tratamento de candidíase vaginal, é administrado sob forma de óvulos na dose única de 300 mg (HOUANG; LAWRENCE, 1985) e pomadas ou cremes a 6,5 % (JONES; BALE; HOBAN, 1993; NYIRJESY, 2008). No tratamento de vulvovaginites, o tioconazol é eficaz na redução dos sintomas e na extinção do agente micológico com taxas de cura entre 85 % e 96 % (HENDERSON, 1983), demonstrando superioridade em relação ao econazol, clotrimazol e miconazol (FROMTLING, 1988).

No tratamento tópico das micoses da pele, o tioconazol é utilizado na forma de creme, loção ou pó, na concentração de 1 % (SWEETMAN, 2006). A aplicação de creme de tioconazol a 1% demonstrou eficácia superior ao creme de miconazol a 2% no tratamento de infecção cutânea causada por *T. rubrum*, com taxas de cura de 80% e 38%, respectivamente (FREDRIKSSON, 1983). É importante salientar que o fármaco, para exercer sua ação, deve permanecer no local da infecção, neste caso, no estrato córneo, uma vez que este é o local de infecção dos dermatófitos. Soube e Sekiguchi (2004) conduziram um estudo referente à absorção percutânea e distribuição intracutânea de soluções tópicas de tioconazol, miconazol e bifonazol (empregados na concentração de 1% cada) e concluíram que o tioconazol alcança concentrações superiores no estrato córneo e na epiderme em relação aos demais fármacos testados.

A escolha de tioconazol para o tratamento de onicomicoses também tem sido estudada (FINCH; WARSHAW, 2007). É indicado como monoterapia em onicomicoses que não envolvam a matriz ungueal, por 6 a 12 meses (MURTHY; MAIBACH, 2013). Em ensaio clínico, a utilização da solução de tioconazol a 28% proporcionou melhora na infecção ungueal causada por *T. rubrum*, *Hendersonula toruloidea* e *Acremonium* e, destes, 22% apresentaram remissão completa dos sintomas. Nenhum voluntário respondeu ao tratamento com griseofulvina ou cetoconazol (HAY; MACKIE; CLAYTON, 1985). Em outro estudo, a solução na mesma concentração de fármaco (28%), demonstrou ação fungicida *in vitro* frente aos principais agentes causadores das infecções ungueais (*T. rubrum* e *C. albicans*) em um período de exposição de cinco minutos (CRYER; ROBINSON, 1997). Apesar do superior desempenho do tioconazol no tratamento destas infecções, a eficácia clínica não demonstra a mesma performance encontrada nos experimentos *in vitro*. Isto ocorre devido à difícil obtenção de uma concentração efetiva do fármaco no local de ação, tendo em vista a baixa penetrabilidade do tioconazol através da placa ungueal (CRYER; ROBINSON, 1997).

Como demonstrado, as formas farmacêuticas e as concentrações de tioconazol nelas presente são variadas. Para o tratamento de lesões na pele encontra-se disponível na forma de creme, loção, *spray* ou pó dermatológico a 1%; para o tratamento de onicomicoses a forma indicada é solução tópica a 28%. No tratamento de vulvovaginites é utilizado em creme ou pomada, na concentração de 6,5% e em óvulos de 300 mg (SWEETMAN, 2006). Todavia, para que se atinja a concentração necessária para a eficácia desejada, principalmente no tratamento de onicomicoses, é necessário que altas concentrações deste fármaco sejam empregadas, em virtude de sua baixa absorção (FROMTLING, 1988). Entretanto, o emprego de altas concentrações de tioconazol tem sido associado ao surgimento de reações adversas, como alergias de contato (STUBB et al., 1992; GUIN; KINKANNON, 1997). A frequência da ocorrência de reações adversas oriundas da aplicação de imidazóis está principalmente relacionada com a concentração utilizada para as diferentes infecções. Dentre eles, o tioconazol é aquele que apresenta maior relação entre a concentração usual e a ocorrência de reações (DOOMS-GOSENS et al., 1995). Ao avaliar durante 42 meses a ocorrência de reações oriundas do contato com tioconazol em 72 pacientes, e obtendo uma alta incidência de reações adversas, Heikkila e colaboradores, em 1996, sugeriram a utilização de tioconazol como marcador para dermatites de contato por imidazóis. Além disso, alergias na região genital são frequentemente relatadas após a administração tópica de formulações contendo tioconazol (SONNEX, 2004).

Novas estratégias vêm sendo propostas a fim de contornar as adversidades apresentadas pelo tioconazol, como baixa solubilidade e efeitos adversos locais. Attama e colaboradores (2011) desenvolveram microemulsões contendo o fármaco a fim de obter uma forma de liberação oral para o mesmo. Um aumento na atividade antifúngica *in vitro* e na biodisponibilidade *in vivo* foi verificada pelos autores. Entretanto, não foi relatado o estudo de eficácia desta formulação para o tratamento de micoses superficiais. Em nosso grupo de pesquisa, Ribeiro e colaboradores (2016) obtiveram produtos secos a partir da desidratação por liofilização e por secagem por aspersão de nanocápsulas poliméricas e nanoemulsões contendo tioconazol. Neste trabalho foi observado que os métodos de secagem não influenciaram na atividade antifúngica do tioconazol, e que as nanocápsulas secas por aspersão apresentaram melhor controle na liberação do fármaco.

### 3.3 MATÉRIAS-PRIMAS DE ORIGEM VEGETAL PARA O TRATAMENTO DE DESORDENS CUTÂNEAS

É crescente a introdução de matérias-primas de origem vegetal nos diversos segmentos da indústria farmacêutica, seja devido à sua atividade medicinal, com propriedades farmacológicas já comprovadas (NASCIMENTO et al., 2007), ou por suas adequadas características de adjuvantes farmacotécnicos (DALLARMI; MIGUEL; CANSIAN, 2012; HOW; RASEDEE; ABBASALIPOURKABIR, 2013). Além disso, há extensa procura por terapias alternativas visando o tratamento tópico de enfermidades. Neste contexto, encontra-se uma vasta quantidade de plantas medicinais, sendo estas detentoras das mais variadas propriedades terapêuticas. Assim, as matérias-primas de origem vegetal estão cada vez mais sendo incorporadas na medicina convencional, utilizadas isoladamente ou como complementação terapêutica (BUCK; NIDORF; ADDINO, 1994; SYED et al., 1999; NASCIMENTO et al., 2007). Dada suas comprovadas propriedades farmacológicas, algumas destas substâncias, como os óleos vegetais (essenciais ou fixos), estão incluídos em farmacopeias, como a Farmacopeia Europeia (BURT, 2004; BAKKALI et al., 2008) e a Farmacopeia Britânica (VEIGA JR.; PINTO, 2002).

Fazendo parte do arsenal natural, destacam-se o óleo de copaíba, o óleo de melaleuca e a manteiga de manga. O óleo de copaíba (*Copaifera* L.), popularmente utilizado como cicatrizante, anti-inflamatório e antisséptico, obteve confirmação científica em estudos de atividade biológica para suas propriedades (VEIGA JR.; PINTO, 2002; PIERI et al., 2009). Este óleo é retirado de canais secretores da árvore (planta nativa da região tropical da América Latina e da África Ocidental) (VEIGA JR.; PINTO, 2002), sendo um produto de desintoxicação da planta e também defesa contra micro-organismos e animais predadores (VEIGA JR.; PINTO, 2002; YAMAGUCHI; GARCIA, 2012). É empregado como medicamento, fixador na indústria de perfumes, secativo na indústria de vernizes a combustível (VEIGA JR.; PINTO, 2002). Este óleo-resina é composto majoritariamente por sesquiterpenos e diterpenos, conferindo a ele propriedades resinosas e voláteis (VEIGA JR.; PINTO, 2002). Estudos demonstram a ação anti-inflamatória e antinociceptiva (GOMES et al., 2007), cicatrizante (PAIVA et al., 2002) e antimicrobiana, incluindo ação frente a bactérias gram-positivas e fungos dermatófitos (SANTOS et al., 2008), como *T. rubrum* e *M. canis*, além de espécies de *Candida* (SVETLICHNY et al. 2015). O óleo de copaíba é constituinte de formulações cosméticas (xampus, loções capilares, sabonetes, cremes)

(VEIGA JR.; PINTO, 2002) e foi aprovado pelo Food and Drug Administration (FDA) como aditivo em alimentos (21CFR 172.510).

Outro óleo vegetal, este, originário da Austrália, que teve seu uso difundido mundialmente por suas propriedades terapêuticas, é o óleo essencial de *Melaleuca alternifolia* (óleo da árvore do chá). Obtido por hidrodestilação a partir das folhas da planta, é extensamente utilizado por sua ação antisséptica, sendo inicialmente empregado para assepsia dos pés e de feridas cutâneas (CARSON; HAMMER; RILEY, 2006). É constituído por monoterpenos e sesquiterpenos, e como principais constituintes, terpinen-4-ol,  $\gamma$ -terpineno e  $\alpha$ -terpineno, sendo estes os responsáveis pela ampla atividade antimicrobiana (CARSON; RILEY, 1995; HAMMER; CARSON; RILEY, 2003). Sua ação antimicrobiana inclui ação antifúngica (frente a leveduras, fungos dermatófitos e outros fungos filamentosos), ação antibacteriana (cepas gram-positivas, gram-negativas e resistentes a antibióticos) (CARSON; HAMMER; RILEY, 2006), além de apresentar atividade antiviral (CARSON et al., 2001; GAROZZO et al., 2009) e antiparasitária (WALTON et al., 2004). Ainda, o óleo de melaleuca demonstrou ser eficaz como anti-inflamatório (HART et al., 2000; FLORES et al., 2014) e cicatrizante (HALCÓN; MILKUS, 2004; FLORES et al., 2014). É utilizado em formulações tópicas como géis, sabonetes e cremes (CARSON; HAMMER; RILEY, 2006). Tanto o óleo de copaíba quanto o óleo de melaleuca foram incluídos em um estudo conduzido por Hadji-Minaglou e Bolcato (2005), o qual sugere a inclusão dos mesmos em formulações galênicas apropriadas, e podem ser alternativas ao tratamento tópico com esteroides em dermatites.

Além dos óleos, outros lipídeos de origem natural vêm ganhando espaço em formulações farmacêuticas, como o óleo de palma hidrogenado (HOW; RASEDEE; ABBASALIPOURKABIR, 2013) e a manteiga de cupuaçu (COLOMÉ et al., 2010), por apresentarem propriedades tecnológicas adequadas e bioatividade (MANDAWGADE; PATRAVALE, 2008b). A manteiga de manga (*Magnifera indica*), por deter atividades antimicrobiana (KABUKI et al., 2000), antioxidante (SOONG; BARLOW, 2004; MAISUTHISAKIL; GORDON, 2009), cicatrizante, anti-inflamatória e umectante (MANDAWGADE; PATRAVALE, 2008a), constitui excelente fonte lipídica para incorporação em formas farmacêuticas de uso tópico (DALLARMI; MIGUEL; CANCIAN, 2012). Sua composição é de, basicamente, ácidos graxos saturados (40%) e insaturados (60%), sendo que dentre os insaturados encontra-se, majoritariamente, o ácido oleico, seguido do linoleico, esteárico e palmítico (MOHARRAM; MOUSTAFA, 1982; GAYDOU, 1984).

### 3.4 SISTEMAS NANOESTRUTURADOS

A nanotecnologia é uma ciência multidisciplinar que envolve diversas áreas como engenharia, eletrônica, física, ciência dos materiais e química. A convergência destas diferentes áreas do conhecimento resulta na síntese, elaboração, caracterização e aplicação destas ferramentas de dimensões submicrométricas nos mais distintos campos (SAHOO; LABHASETWAR, 2003; SAHOO; PARVEEN; PANDA, 2007; SANDHIYA; DKHAR; SURENDIRAN, 2009), incluindo células solares econômicas e baterias de alta performance, eletrônica, mecatrônica, alimentação e agricultura (ETHERIDGE et al., 2013). Entretanto, a área da saúde, que corresponde a uma fusão entre a medicina e a nanotecnologia (nanomedicina), é responsável por notável exploração desta tecnologia (SAHOO; PARVEEN; PANDA, 2007; KAUR et al., 2010), sendo explorada no desenvolvimento de novos medicamentos, para imagem e diagnóstico, tratamento para o câncer, implantes, regeneração de tecidos, além de plataformas multifuncionais (ETHERIDGE et al., 2013).

Voltada para a área farmacêutica que engloba cerca de 20 % das pesquisas, a nanotecnologia surge como ferramenta na redescoberta de fármacos mais antigos, podendo aumentar a vida útil destes, através da reformulação com novo sistema de entrega e, com isso, a proteção patentária pode ser aumentada. Não obstante, o desenvolvimento de formulações de liberação modificada envolve pesquisa de baixo custo se comparado à descoberta e ao desenvolvimento de novas moléculas (KAUR et al., 2010). Neste contexto, os sistemas coloidais tem sido alvo de importantes estudos no que tange a questão de aperfeiçoar a liberação de substâncias de uma forma precisa, segura e reprodutível, atuando como um sistema carreador de fármacos. Estes sistemas são capazes de exercer um controle na liberação, propiciando efeito terapêutico máximo com o mínimo de efeitos adversos, pois, com sua elevada área superficial e reduzida fração volumétrica (MISHRA; PATEL; TIWARI, 2010), demonstram benefícios médicos e farmacêuticos. Dentre os inúmeros benefícios, merecem destaque a melhora na solubilidade de substâncias; modificações na farmacocinética e biodistribuição de agentes terapêuticos; controle no tempo de circulação sanguínea; direcionamento e acúmulo do princípio ativo ao local desejado, minimizando sua toxicidade e ocorrência de efeitos colaterais (HUYNH et al., 2009; MISHRA; PATEL; TIWARI, 2010).

O interesse farmacêutico a respeito desses sistemas concentra-se, principalmente, nos lipossomas, nanoemulsões, nanopartículas poliméricas e nanopartículas lipídicas. Os lipossomas, com uma ou mais lamelas, são vesículas compostas basicamente de uma bicamada de fosfolípido e colesterol e são biocompatíveis. São aptos a carrear substâncias

tanto hidrofílicas quanto lipofílicas, visto que são constituídos por um núcleo aquoso (SANDHIYA; DKHAR; SURENDIRAN, 2009). As nanopartículas lipídicas foram desenvolvidas com o intuito de obter um carreador alternativo para as emulsões. Suas partículas são compostas por lipídeos sólidos, ou ainda, uma mistura de lipídeos sólidos e líquidos, estabilizadas por tensoativos. As nanoemulsões são dispersões óleo/água ou água/óleo, com suas gotículas estabilizadas por tensoativos. Devido ao tamanho nanométrico de suas gotículas, fenômenos de desestabilização são impedidos por repulsão estérica entre elas (ANTON; BENOIT; SAULNIER, 2008). As nanopartículas poliméricas constituem as nanoesferas e as nanocápsulas, diferindo entre si na estrutura e na composição. As nanoesferas são sistemas matriciais poliméricos, onde o fármaco pode estar retido, ou simplesmente adsorvido na superfície. Já as nanocápsulas apresentam um núcleo oleoso, o que permite uma alta taxa de encapsulação de fármacos lipossolúveis. Este núcleo é circundado por um fino invólucro polimérico (VAUTHIER; BOUCHEMAL, 2009).

Uma vez que, ao veicular substâncias nestes carreadores, prevalecem as características físico-químicas do carreador em detrimento do fármaco, pode levar ao contorno de obstáculos gerados pelas propriedades físico-químicas da substância de interesse, como o aumento na solubilidade aparente de compostos pouco solúveis (MERISKO-LIVERSIDGE; LIVERSIDGE; COOPER, 2003; POHLMANN et al., 2013); uma maior e melhor distribuição da substância ativa no local de ação e o seu direcionamento ao sítio específico e com isso, a redução dos efeitos toxicológicos, adversos e colaterais (MISHRA; PATEL; TIWARI, 2010). Além disso, proporcionam aumento na estabilidade de substâncias, reduzindo sua exposição às intempéries do meio, como oxidação (WEISS-ANGELI et al., 2008), luz (OURIQUE et al., 2008; FONTANA et al., 2009; SAVIAN et al., 2015) e hidrólise (CATTANI et al., 2010), mudanças de pH (SAHOO; PARVEEN; PANDA, 2007) ou protegendo-as da volatilização (FLORES et al., 2011). Outra característica importante atribuída a tais sistemas é a liberação controlada, liberando a substância ativa paulatinamente (ANTON; BENOIT; SAULNIER, 2008; SANDHIYA; DKHAR; SURENDIRAN, 2009) permitindo, assim, a manutenção de seus níveis efetivos. Essas vantagens estão diretamente ligadas com o aumento da eficácia que pode ser conferida por estes nanossistemas.

Diante das inúmeras vantagens advindas da veiculação de substâncias a sistemas nanoestruturados, bem como a diversidade de sistemas, a presente revisão de literatura terá como foco os nanossistemas lipídicos e poliméricos.

### 3.4.1 Nanopartículas lipídicas

Com o intuito de se obter carreadores alternativos e com maior biocompatibilidade às emulsões, nanoemulsões, lipossomas e nanopartículas poliméricas, as nanopartículas lipídicas foram desenvolvidas (SCHÄFER-KORTING; MEHNERT; KORTING, 2007; ANTON; BENOIT; SAULNIER, 2008; PARDEIKE; HOMMOSS; MÜLLER, 2009). As nanopartículas lipídicas sólidas (NLS) são matrizes lipídicas nanométricas, sólidas à temperatura ambiente, dispersas em meio aquoso e estabilizadas por tensoativos. Estas estruturas possuem vantagens em relação aos lipossomas e às nanoemulsões, como proteção da substância ativa e maior flexibilidade em modular a liberação da mesma (MÜLLER; RADTKE; WISSING, 2002). Na produção das NLS, preparadas apenas com lipídios sólidos, uma parte dos lipídeos pode sofrer cristalização em alta energia, e, durante o armazenamento, pode ocorrer uma transição para uma conformação de menor energia, reduzindo o número de imperfeições nos cristais. Com uma matriz mais organizada, sem a presença dos clusters que “acomodam” a substância ativa, esta acaba sendo expulsa da partícula durante o armazenamento (PARDEIKE; HOMMOSS; MÜLLER, 2009). Além disso, esta peculiar estrutura limita a capacidade de associação da substância ativa no interior da partícula (MÜLLER et al., 2007). Cabe ressaltar que a capacidade de associação do fármaco às NLS depende da solubilidade e da miscibilidade do fármaco no lipídio fundido, da estrutura físico-química da matriz lipídica sólida e do estado polimórfico do material lipídico (MÜLLER, MÄDER; GOHLA, 2000).

A fim de contornar algumas limitações das nanopartículas lipídicas sólidas, uma segunda geração de nanopartículas lipídicas foi desenvolvida e denominada de carreadores lipídicos nanoestruturados (CLN) (MÜLLER; RADTKE; WISSING, 2002; MÜLLER et al., 2007; PARDEIKE; HOMMOSS; MÜLLER, 2009). Constituídos de uma mistura de lipídio sólido e líquido, estes carreadores exibem menor temperatura de fusão em relação às primeiras; entretanto, continuam sólidos à temperatura corporal (MÜLLER; RADTKE; WISSING, 2002). Comparados às NLS, os CLN apresentam maior capacidade de incorporação de substâncias ativas, menor conteúdo de água na partícula em suspensão e a prevenção ou redução da expulsão do fármaco durante o armazenamento (PARDEIKE; HOMMOSS; MÜLLER, 2009).

Os nanossistemas lipídicos são vantajosos para diferentes aplicações. São sistemas que promovem o controle de liberação de substâncias e são formados por lipídios fisiológicos e biodegradáveis, exibindo baixa toxicidade e citotoxicidade (PARDEIKE et al., 2011).

Inúmeras vantagens são atribuídas a esses sistemas, como melhora na solubilidade aquosa da substância encapsulada, com subsequente melhora na absorção (MÜLLER et al., 2008; KAMIYA et al., 2010; PARDEIKE et al., 2011; WANG et al., 2012); melhora na biodisponibilidade oral (MÜLLER et al., 2006) e na farmacocinética (FUKUI et al., 2003a; KIM; PARK; KIM, 2010); redução da toxicidade (JUNG et al., 2009) e proteção frente a fotodegradação (SOUTO; MÜLLER, 2005; GAMBHIRE; BHALEKAR; SHIVASTAVA, 2012; DETONI et al., 2012). Além disso, é possível o controle da cinética de liberação, mantendo a concentração do fármaco dentro da janela terapêutica (KUMAR; RANDHAWA, 2013).

Os sistemas lipídicos nanoparticulados foram inicialmente desenvolvidos para administração parenteral levando em consideração o controle no tamanho de partícula e a tolerabilidade pelo paciente. Devido às inúmeras vantagens desses sistemas, foi crescendo o interesse em desenvolver sistemas de liberação para as mais diferentes vias de aplicação, como oral, ocular e, principalmente tópica (KUMAR; RANDHAWA, 2013).

### **3.4.2 Nanopartículas poliméricas**

As nanopartículas poliméricas compreendem as nanoesferas e as nanocápsulas, e diferem entre si nos constituintes e na estrutura por eles formada. As nanoesferas são estruturas poliméricas matriciais, nas quais o fármaco pode estar retido ou adsorvido à superfície; já as nanocápsulas são estruturas formadas por um núcleo lipofílico ou hidrofílico envolto por uma fina parede polimérica (VAUTHIER; BOUCHEMAL, 2009; POHLMANN et al., 2013). Esta estrutura de “núcleo e coroa” permite altas taxas de encapsulamento tanto para fármacos lipossolúveis, quanto para hidrossolúveis, dependendo da natureza do núcleo (ANTON; BENOIT; SAULNIER, 2008; VAUTHIER; BOUCHEMAL, 2009; MISHRA; PATEL; TIWARI, 2010). A presença de monoestearato de sorbitano disperso no núcleo oleoso define um tipo peculiar de nanocápsulas, as nanocápsulas de núcleo lipídico (JÄGER et al., 2009), apresentando como uma das principais vantagens a possibilidade de modular a liberação de fármacos altamente lipossolúveis em função de variações na concentração deste lipídio no núcleo das nanocápsulas (VENTURINI et al., 2011; POHLMANN et al., 2013).

Quanto à distribuição da substância ativa, a suspensão coloidal pode ser classificada: tipo I (100% do fármaco se encontra disperso na fase externa); tipo II (uma parte do fármaco está dispersa no meio externo e outra parte localizada na parede polimérica); tipo III (uma parte do fármaco encontra-se na fase externa e outra parte na partícula, tanto na parede

polimérica, quanto no núcleo oleoso; tipo IV (100% da substância ativa localiza-se na nanocápsula, sendo que a maior parte encontra-se na interface desta pseudo-fase); tipo V (o fármaco está supersaturado, sem a presença de precipitados, e parte está agregado na fase externa e outra parte na nanoestrutura); tipo VI (100% do fármaco encontra-se na partícula e sua maior parte na núcleo) (OLIVEIRA et al., 2013).

Os principais polímeros utilizados na obtenção de nanopartículas poliméricas, sejam elas nanocápsulas ou nanoesferas, são preferencialmente densos, rígidos e biodegradáveis (ANTON; BENOIT; SAULNIER, 2008), podendo ser de origem sintética, como polímeros do ácido lático (PLA), poli( $\epsilon$ -caprolactona) (PCL), poli(acrilato) e poli(metacrilato) (Eudragits), e de origem natural, como a quitosana, alginato, gelatina e albumina; e ainda podem ser copolímeros sintéticos como ácido lático-co-glicólico (PLGA), poli(lático)-poli(etileno glicol) (PLA-PEG), poli(lático-co-glicólico)-poli(etileno glicol) (PLGA-PEG), entre outros (VAUTHIER; BOUCHEMAL, 2009). A escolha do tipo de polímero varia de acordo com o método de preparação e com a aplicação do nanocarreador (MISHRA; PATEL; TIWARI, 2010).

Estudos demonstram a potencialidade da parede polimérica em proteger as substâncias da fotodegradação quando comparados à substância livre. Perugini e colaboradores (2002) demonstraram uma redução na extensão de fotodegradação do trans-2-etilexil-p-metoxicinamato. Uma fotoproteção cerca de três vezes maior da tretinoína também foi verificada após sua incorporação em nanocápsulas, em relação ao fármaco livre após oito horas de exposição à radiação ultravioleta (OURIQUE et al., 2011). Comparando diferentes sistemas (nanoemulsões e nanocápsulas poliméricas), Fontana e colaboradores (2009) descreveram o aumento da fotoproteção conferido pela presença do polímero. Outros tipos de proteção foram verificados para formulações de nanocápsulas poliméricas, como proteção frente à volatilização, observada por Flores e colaboradores (2011), onde as nanocápsulas poliméricas desempenharam importante papel protetor na manutenção da concentração do óleo essencial de melaleuca, seguido das formulações de nanoemulsões. Após administração oral em ratos, foi possível verificar proteção frente à hidrólise da indometacina, quando associada à nanocápsulas (CATTANI et al., 2010). É importante ressaltar que a presença do polímero nas nanopartículas é o principal fator responsável pelo controle da liberação da substância ativa (FONTANA et al., 2009; CONTRI et al., 2011; FONTANA et al., 2011) e este controle é dependente da concentração do mesmo (POLETTO et al., 2008).

Objetivando aumentar o tempo de contato das nanopartículas às superfícies biológicas alvo (bioadesão), estudos têm sido conduzidos no sentido de conferir potencial de superfície

positivo às nanopartículas. O potencial positivo pode ser gerado a partir da utilização de polímeros catiônicos na preparação das nanopartículas, como o Eudragit® RS100 (SANTOS et al., 2013; SANTOS et al., 2014) e quitosana (CAMPOS; SANCHES; ALONSO, 2001; XIAO et al., 2015), ou a partir do revestimento das mesmas com polímeros com grupos funcionais carregados positivamente (CALVO, VILA-JATO, ALONSO, 1997; CAMPOS et al., 2003; SIQUEIRA et al., 2011; LOCH-NECKEL et al., 2015).

### **3.4.3 Veiculação de antimicrobianos a sistemas nanoparticulados**

As nanopartículas apresentam propriedades peculiares, como reduzido tamanho, elevada área superficial, o que contribui para interações com micro-organismos e células hospedeiras, e versatilidade funcional e estrutural, tornando-se plataformas promissoras para contornar limitações nos tratamentos antimicrobianos convencionais (HUH; KWON, 2011).

A associação de antimicrobianos a sistemas nanoestruturados tem sido extensamente explorada, demonstrando a potencialidade desses sistemas em aumentar o índice terapêutico, com a consequente redução da toxicidade apresentada. Além disso, consiste em uma estratégia para melhorar a solubilidade de fármacos pouco solúveis em água, aumentar a biodisponibilidade do fármaco, prolongar a meia vida e a circulação sistêmica e reduzir a frequência de administração, com a possibilidade de aumento na adesão ao tratamento (RANJITA; LOAYE; KHALIL, 2011; HUH; KWON, 2011). Devido às suas dimensões reduzidas, as partículas nanoscópicas são hábeis em explorar fenômenos que ocorrem com os micro-organismos a um nível subcelular (MURALIMONHAN et al., 2009). Ainda, a resistência microbiana frente aos medicamentos existentes pode ser contornada através da co-liberação de diferentes fármacos antimicrobianos a partir de uma mesma nanopartícula (HUH; KWON, 2011).

Estudos acerca da incorporação de fármacos antibacterianos em sistemas nanoestruturados poliméricos demonstram resultados promissores em relação ao mesmo fármaco em solução. Gupta e colaboradores (2010) ao desenvolver nanopartículas de PLGA contendo esparfloxacino, verificaram um aumento no tempo de permanência ocular e na biodisponibilidade do fármaco, além de melhorar a tolerabilidade da formulação. Outros estudos visando à obtenção de liberação controlada de ciprofloxacino, quando veiculado à nanopartículas de poli(2-hidroxietil metacrilato) (PHEMA) (CHOUHAN; BAJPAI, 2010), de Eudragit® RS100 ou de Eudragit® RS100/PLGA (DILLEN et al., 2006), demonstraram resultados satisfatórios. Pesquisas relatam a melhora na atividade antibacteriana de fármacos

associados a sistemas carreadores. A incorporação de claritomicina a nanopartículas de PLGA foi capaz de reduzir em oito vezes a concentração inibitória mínima do fármaco frente a *S. aureus* (MOHAMMADI et al., 2011). Nanocápsulas de PCL contendo clorexidina foram capazes de prolongar o efeito antibacteriano tópico do fármaco em infecção cutânea (*ex vivo*) por *S. epidermidis* (LBOUTOUNNE et al., 2002).

Dentre as principais vantagens da utilização de nanopartículas poliméricas para a liberação de antimicrobianos estão a estabilidade estrutural em fluidos biológicos, a facilidade de ajuste nas características físico-químicas de acordo com a aplicação, além da facilidade e versatilidade de funcionalização de superfície (HUH; KNOW, 2011). As nanopartículas poliméricas, preparadas a partir de polímeros biodegradáveis, apresentam características vantajosas para a liberação de agentes antimicrobianos. Assim, estes sistemas têm sido explorados a fim de aperfeiçoar o tratamento de diversos tipos de infecções ao facilitar a entrega do fármaco ao sítio da infecção (ZHANG et al., 2010; HUH; KWON, 2011).

Com o intuito de melhorar as propriedades de fármacos antifúngicos, diversos trabalhos apontam para a associação dos mesmos aos sistemas nanoestruturados. Assim, a griseofulvina, quando incorporada a nanocápsulas de PCL apresentou maiores taxas de dissolução em relação a sua forma micronizada (ZILI; SFAR; FESSI, 2005). Visando a obtenção de formulações de liberação sustentada para o metronidazol, Elzatahary e Eldin (2008) incorporaram o fármaco a nanopartículas de quitosana e, mais tarde, Saboktakin e colaboradores (2011) associaram o mesmo à nanopartículas de quitosana tiolada. Santos e colaboradores observaram fotoproteção, controle de liberação do clotrimazol e atividade antifúngica frente a espécies de *Candida* ao associar este fármaco a nanocápsulas poliméricas de triglicerídeos de cadeia média (SANTOS et al., 2013). O mesmo foi observado para nanocápsulas poliméricas contendo como núcleo oleoso óleo de coco. Além disso, superior atividade antifúngica foi observada para as suspensões de nanocápsulas quando comparado ao clotrimazol não associado (SANTOS et al., 2014).

Ao associar a anfotericina B à nanoesferas de PCL, Espuelas e colaboradores (2007) observaram a redução da toxicidade do fármaco em ensaios em ratos. Além disso, nanopartículas de PLGA contendo anfotericina B apresentaram superior eficácia no controle de infecções causadas por *A. fumigatus* em ratos (VAN de VEN et al., 2012). Atividade antifúngica superior ao fármaco livre *in vitro* e *in vivo* foram observadas após a inclusão de voriconazol à nanopartículas de PLGA (PENG et al., 2008).

Objetivando o prolongamento do tempo de contato do fluconazol na córnea, o mesmo foi veiculado à goma cordia por Yadav e Ahuja (2010). Posteriormente, nanopartículas

mucoadesivas de quitosana contendo natamicina foram desenvolvidas por Bhatta e colaboradores (2012). A obtenção dessa suspensão coloidal oportunizou o aumento na retenção pré-corneal, alta biodisponibilidade ocular e probabilidade de redução de dose e frequência de administração devido ao aumento da atividade antifúngica se comparada à solução de natamicina, quando avaliada em coelhos.

Devido às características únicas dos sistemas nanoparticulados lipídicos, estes acabam tornando-se uma plataforma promissora para a entrega de fármacos antimicrobianos. A fim de contornar problemas relacionados à baixa solubilidade de compostos antifúngicos, diferentes fármacos foram associados a sistemas lipídicos nanoestruturados. Nanopartículas lipídicas de griseofulvina demonstraram aumento na sua taxa de dissolução (KAMIYA et al., 2010). Carreadores lipídicos nanoestruturados contendo itraconazol foram desenvolvidos para administração pulmonar, contornando sua baixa solubilidade (PARDEIKE et al., 2011). A associação de cetoconazol a CLN proporcionou maior estabilidade frente à luz (SOUTO; MÜLLER, 2005). Das e colaboradores (2012) desenvolveram NLS e CLN contendo clotrimazol e obtiveram controle na liberação do fármaco e estabilidade das suspensões.

Outra vantagem conferida por estes sistemas é a possibilidade de incorporação de maior quantidade de fármaco. De posse dessa informação, Pandey e colaboradores (2005) desenvolveram nanopartículas lipídicas sólidas (NLS) contendo três diferentes antibacterianos associados: rifampicina, isoniazida e pirazinamida. Neste estudo os autores verificaram o controle na liberação dos três fármacos e, após administração oral em ratos, os mesmos permaneceram em níveis detectáveis até 192 horas. Posteriormente, Pandey e Khuller (2005) observaram um aumento na atividade antibacteriana em cobaias infectadas por *Mycobacterium tuberculosis* após nebulização da associação dos três antibióticos veiculados à NLS.

Voltadas para a aplicação tópica, NLS e CLN contendo clotrimazol foram desenvolvidas e demonstraram controle de liberação por até 10 horas (SOUTO et al., 2004). Nanopartículas lipídicas sólidas contendo nitrato de miconazol favoreceram a penetração cumulativa na pele humana (*in vitro*) e a vetorização cutânea do antifúngico (BHALEKAR et al., 2009). Igualmente, a permeação de econazol em pele suína foi favorecida a partir de formulações de nanopartículas lipídicas (SANNA; CARIA; MARIANI, 2010). Ao incorporar o fluconazol em NLS e CLN, foi observada maior retenção do antifúngico na pele, prolongando o tempo de residência local, com maior concentração no estrato córneo em relação ao fármaco livre. Após oito dias de tratamento tópico, as formulações lipídicas reduziram a infecção por *C. albicans* e culturas negativas foram observadas, enquanto que no

grupo tratado com a solução, o número de colônias demonstrou ser muito superior (GUPTA; VYAS, 2012). Estudos acerca da incorporação de terbinafina em nanopartículas lipídicas sólidas demonstraram maior retenção em ensaio *in vitro* em pele de ratos e maior efetividade em menor período de tempo após infecção dos animais (ratos) por *C. albicans* (VAGHASIYA; KUMAR; SAWANT, 2013).

Assim, as nanopartículas lipídicas têm sido amplamente estudadas para a vetorização de fármacos antimicrobianos para administração oral, parenteral, tópica, ocular e pulmonar, aumentando a sua biodisponibilidade. Estes sistemas oferecem especial vantagem quando aplicados sobre a pele, pois tendem a aderir à superfície, formando uma película hidrofóbica oclusiva, aumentando o tempo de residência no estrato córneo. Aliado a isso, estudos demonstram o aumento da difusão transdérmica de antifúngicos insolúveis em água quando associados às nanopartículas lipídicas (HUH; KWON, 2011).

#### **3.4.4 Incorporação de nanopartículas em formas farmacêuticas para uso tópico**

Ao mensurar a ocorrência de efeitos colaterais e adversos vinculados aos tratamentos sistêmicos, sejam quais forem as desordens, a rota tópica para a administração de fármacos em determinada área da pele deve ser considerada. Soma-se a isto a possibilidade de autoadministração, levando à maior adesão do paciente (KAUR; KAKKAR, 2010). Neste contexto, o tempo de retenção na pele e a penetração da substância ativa através dela são parâmetros determinantes na escolha desta via (KUMAR; HANDHAWA, 2013).

Entretanto, a presença do estrato córneo, com sua estrutura de células coesas e justapostas, consiste em um obstáculo para o transporte de substâncias através da pele (BANERJEE, 2013). A nanotecnologia torna-se uma ferramenta atraente para este intuito, uma vez que estes sistemas são capazes modular a difusão transdérmica de fármacos com a alteração dos coeficientes de partição ou difusão (GUTERRES, ALVES, POHLMANN, 2007). São aptos a fluidificar o revestimento lipídico do estrato córneo ou penetrar na pele ao longo dos folículos pilosos e glândulas sudoríparas (BANERJEE, 2013) e, por apresentarem reduzido tamanho de partícula, formam um fino filme sobre a pele, proporcionando, assim, um maior poder de cobertura e contato mais íntimo da substância ativa com o estrato córneo (ALVAREZ-ROMÁN et al., 2004). Além disso, podem aumentar o tempo de permanência da substância no local, característica relevante tratando-se de locais expostos ao ambiente, sofrendo fricções constantes com roupas, utensílios e de fácil remoção pelas atividades cotidianas (GUTERRES; ALVES; POHLMANN, 2007; SCHAFER-KORTING; MEHNERT;

KORTING, 2007). Especialmente as nanopartículas com características de superfície positivas apresentam potencial em aumentar o tempo de residência no estrato córneo, uma vez que este apresenta cargas negativas, permitindo assim uma atração eletrostática entre o tecido e a nanopartícula (SIQUEIRA et al., 2011). As nanopartículas lipídicas, em especial, possuem a habilidade em formar um filme hidrofóbico e oclusivo, aumentando a hidratação da pele, influenciando na absorção percutânea (PARDEIKE et al., 2011). Não obstante, o tamanho reduzido destes sistemas coloidais propicia o desenvolvimento de formulações dermatológicas com aplicação confortável (GUTERRES; ALVES; POHLMANN, 2007).

Tendo em vista as vantagens oferecidas pelos nanossistemas em relação à aplicação tópica de substâncias para liberação cutânea ou transepidermal, é crescente o desenvolvimento de formulações com este intuito. Geralmente, as formas farmacêuticas empregadas para uso tópico são géis e cremes devido à fácil adequabilidade e controle de suas propriedades reológicas em função das características necessárias para aplicação cutânea (GUTERRES; ALVES; POHLMANN, 2007). Levando em consideração que as formulações nanoestruturadas de maior interesse farmacêutico são suspensões aquosas, estas são em sua maioria, incorporadas a veículos hidrofílicos, como hidrogéis (ALVES, 2006), os quais oferecem flexibilidade, hidrofiliabilidade, versatilidade, biocompatibilidade e alta capacidade de absorção de água (HAMIDI; AZADI; RAFIEI, 2008). Cabe salientar que a escolha do veículo a ser empregado deve levar em consideração o objetivo da aplicação, pois suas propriedades reológicas podem sofrer variações de acordo com a natureza e as concentrações dos constituintes, refletindo no perfil de espalhabilidade do produto no local desejado (GUTERRES; ALVES; POHLMANN, 2007), sendo que as propriedades físico-químicas e a interação do veículo com o fármaco determinam a distribuição da substância de interesse na pele (PARDEIKE; HOMMOSS; MÜLLER, 2009; MODDARESI et al., 2010).

A diversidade de formulações semissólidas de base nanotecnológica é grande, oferecendo diferentes comportamentos e texturas. Para a preparação de géis, diferentes polímeros encontram-se descritos na literatura. Na incorporação de nanopartículas poliméricas em hidrogéis, há relatos dos seguintes agentes de geleificação: Satiaxane<sup>®</sup> CX 91 (ALVAREZ-ROMÁN et al., 2001); Carbopol<sup>®</sup> 940 (MILÃO et al., 2003; ALVES; POHLMANN; GUTERRES, 2005; ALVES et al., 2007; TEIXEIRA et al., 2010); Pluronic<sup>®</sup> F127 (MIAZAKI et al., 2005); Natrosol<sup>®</sup> 250M (LUENGO et al., 2006); Carbopol<sup>®</sup> Ultrez 10 NF (MARCHIORI et al., 2010; OURIQUE et al., 2011; FONTANA et al., 2011; FLORES et al., 2014); Hidroxipropilmetil celulose (BATHEJA et al., 2011; SHAH et al., 2012); Carbopol<sup>®</sup> 981 NF (SHAH et al., 2012) e Aristoflex<sup>®</sup> AVC (SAVIAN, 2012; HÄRTER,

2013). Em estudos com nanopartículas lipídicas, os mais utilizados são: Carbopol® 934 (SOUTO et al., 2004); Quitosana (SOUTO et al., 2004); Carbopol® Ultrez 10 NF (JOSHI; PATRAVALE, 2008); polímeros do ácido hialurônico (MODDARESI et al., 2010); Carbopol® 940 (HAN et al., 2012; CHAWLA; SARAF, 2012) e Carbopol® 980 NF (VAVIA; WAVIKAR, 2013).

O desenvolvimento de formulações adequadas às peculiaridades de cada situação patológica é fundamental, pois sabe-se que um dos fatores críticos para o sucesso de uma terapia antifúngica tópica encontra-se no tempo de residência da substância ativa no local de ação (KAUR; KAKKAR, 2010), para que o mesmo alcance a sua concentração terapêutica (MONTI et al., 2010).

Levando em consideração a problemática no tratamento de infecções fúngicas superficiais de unha, os esmaltes apresentam uma adequada opção, uma vez que estes formam um filme resistente, se comparados às demais formas farmacêuticas, como cremes, soluções e géis (MONTI et al., 2005). Entretanto, os esmaltes são constituídos de resinas insolúveis, sendo apenas removíveis com solventes orgânicos, o que pode causar irritação e danos às unhas e tecidos adjacentes. Além disso, não são aplicáveis a regiões periungueais (MONTI et al., 2010), o que não torna possível o tratamento das pararoníqueas. Não obstante, após a aplicação destas formulações, o solvente orgânico evapora rapidamente, resultando na formação de cristais de fármaco, incapazes de particionar e difundir através da placa da unha (GUPTA; TU, 2006). O desenvolvimento de formulações formadoras de filme hidrossolúveis por Monti e colaboradores (2005; 2010) demonstrou ser menos irritante e mais eficaz ao proporcionar maior penetrabilidade da substância ativa, quando comparado ao esmalte orgânico, devido à maior afinidade do filme formado com a placa de queratina da unha e a formação de um reservatório de fármaco, além de ser passível à aplicação nas pregas ungueais.

## **CAPÍTULO 1:**

**Nanopartículas lipídicas obtidas a partir de materiais naturais inovadores para  
liberação tópica de tioconazol: Mangoesferas**

Artigo submetido ao Journal of Nanoscience and Nanotechnology

---



## **CAPÍTULO 1: Nanopartículas lipídicas obtidas a partir de materiais naturais inovadores para liberação tópica de tioconazol: Mangoesferas**

### 1.1 INTRODUÇÃO

O presente capítulo compreendeu o desenvolvimento de sistemas nanoestruturados lipídicos contendo o fármaco em estudo e sua associação com a manteiga de manga (nanopartículas lipídicas sólidas) e o óleo de melaleuca (carreadores lipídicos nanoestruturados): Mangospheres. As formulações, após preparação, foram avaliadas em relação as suas propriedades físico-químicas, perfil de liberação *in vitro* e atividade antifúngica *in vitro*.

Adicionalmente, hidrogéis de Carbopol® Ultrez contendo as nanopartículas lipídicas sólidas e os carreadores lipídicos nanoestruturados foram preparados e caracterizados. Ainda, a avaliação *in vitro* da penetração do fármaco a partir das formulações semissólidas foi conduzida, utilizando como membrana a pele suína.

Cabe salientar o ineditismo da utilização das duas matérias-primas vegetais (manteiga de manga e óleo de melaleuca) na preparação de formulações coloidais lipídicas para os objetivos propostos.

Nesta etapa do trabalho, o desenvolvimento dos sistemas nanoestruturados lipídicos, estudos de liberação, bem como os estudos de permeação do semissólido foram realizados na Faculdade de Farmácia da UFRGS.

LIPID NANOPARTICLES OBTAINED WITH INNOVATIVE NATURAL MATERIALS  
FOR TOPICAL DELIVERY OF TIOCONAZOLE: MANGOSPHERES

Fernanda C. Flores<sup>a</sup>, Karina Paese<sup>b</sup>, Julia Weber<sup>a</sup>, Joseane B. Antunes<sup>c</sup>, Adriana R. Pohlmann<sup>b</sup>, Silvia S. Guterres<sup>b</sup>, Ruy C. R. Beck<sup>b</sup>, Cristiane de B. da Silva<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup>Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal de Santa Maria, Av. Roraima, 1000, Santa Maria, RS, 97105-900, Brazil

<sup>b</sup>Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Av. Ipiranga, 2752, Porto Alegre, RS, 90610-000, Brazil

<sup>c</sup>Curso de Farmácia, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Santa Maria Av. Roraima, 1000, Santa Maria, RS, 97105-900, Brazil

\*Corresponding author: Cristiane de Bona da Silva

Departamento de Farmácia Industrial, Curso de Farmácia, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Santa Maria Av. Roraima, 1000, Santa Maria, RS, 97105-900, Brazil  
Tel: +55 55 3220-8452 Fax: +55 55 3220-8248

E-mail address: csbona@smail.ufsm.br

E-mail address:

Fernanda C. Flores: floresfernandac@gmail.com

Karina Paese: karinapaese@gmail.com

Julia Weber: weber.julia@gmail.com

Joseane B. Antunes: joseanebrites@gmail.com

Adriana R. Pohlmann: adriana.pohlmann@ufrgs.br

Silvia S. Guterres: silvia.guterres@ufrgs.br

Ruy C.R. Beck: ruy.beck@gmail.com

## Abstract

The aim of this study was to develop hydrogels containing innovative tioconazole-loaded lipid nanoparticles, named Mangospheres (MGS), for topical delivery. These systems can be classified in solid lipid nanoparticles and nanostructured lipid carriers, using mango butter and melaleuca oil (TTO) and were named TIO-MGS and TIO-TTO-MGS, respectively. The liquid colloidal dispersions had a mean particle size of around 100 nm, low polydispersity index and negative zeta potential. Tioconazole content was 1.64 mg ml<sup>-1</sup> and 1.74 mg ml<sup>-1</sup> for TIO-MGS and TIO-TTO-MGS, respectively. Both formulations showed biexponential release profiles, and TIO-TTO-MGS demonstrated greater control of tioconazole release for 30 h. Both formulations presented antifungal activity against *Candida albicans* using the agar well diffusion method. The nanoparticles were preserved after incorporation into anionic hydrogels. Mean particle sizes of HG-TIO-MGS and HG-TIO-TTO-MGS were 161 ± 7 nm and 143 ± 21 nm, respectively, and drug contents similar to those in the original aqueous suspensions. *In vitro* skin retention studies performed on porcine skin revealed that the drug was retained in stratum corneum after the administration of hydrogels containing TIO-MGS or TIO-TTO-MGS. On the other hand, the hydrogel containing non-encapsulated tioconazole was mainly detected in the epidermis and dermis. These results suggest that hydrogels prepared with the innovative tioconazole-lipid particles are an interesting approach to targeting the stratum corneum for the release of tioconazole, the site of infection of dermatophyte fungi.

**Key words:** mangospheres; lipid nanocarriers; tioconazole; mango butter; melaleuca oil; hydrogel.

## 1. Introduction

Colloidal lipid systems have been studied considering specially the topical application route. These systems are usually composed of a solid lipid (nanoparticles) or mixtures of solid and liquid lipids (nanostructured lipid carrier), and are stabilized by surfactants [1, 2]. The solid lipids commonly used to prepare SLN are glycerol behenate, glycerol palmitate, and cetyl palmitate, while to obtain NLC those are combined with liquid lipids — mainly medium chain triglycerides [3]. They associate the advantages of solid nanoparticles with the benefits of liposomes and nanoemulsions [1, 4, 5]. These carriers have properties such as reduced particle size, occlusive characteristics, and close contact with the skin surface, which make an advantageous choice for topical administration [1, 3, 4]. Additionally, there is a growing interest in the use of natural raw materials like fruit kernel fats [6], laurel essential oil, grape seed oil [7] and Cupuaçu seed butter [8] to obtain innovative lipid nanoparticles.

Superficial mycoses are among the most prevalent infectious diseases in the world [9]. These diseases are mainly caused by dermatophyte fungi of the genera *Epidermophyton*, *Microsporum* and *Trichophyton*, and some yeasts, like *Candida* spp. These fungi have a predilection for keratin, from which they obtain nutrients [10], leading to an inflammatory lesion which enhances keratin destruction [11]. Ideally, a treatment for such infections should be topically effective at low concentrations, in addition to having high affinity for the stratum corneum [12]. However, these features are hard to achieve because the main antifungal drugs, such as polyene and azole derivatives, for instance, are lipophilic [12]. This impairs their release at the target tissue, reducing bioavailability [13].

In this scenario, different classes of antifungal drugs have been associated with lipid nanoparticles, such as griseofulvin [14], itraconazole [15], cetoconazole [16], and clotrimazole [17, 18], aiming at an improvement in physicochemical properties that

eventually leads to higher drug bioavailability. Tioconazole is a broad-spectrum, lipophilic imidazole derivative antifungal agent [19], which is indicated for the topical treatment of nail and skin dermatophytosis and vaginal candidiasis [20]. However, its fungicidal effect is a function of concentration [21]. In this sense, excessive concentrations of tioconazole have been associated with adverse drug reactions, such as contact dermatitis [22]. Considering these aspects, an ideal formulation would be one that affords the antifungal drug to reach the site of infection and, therefore, the hyphae and arthroconidia at sufficient and effective concentration [13]. For this reason, the pharmaceutical formulation should ensure a sufficient residence time of the active substance on the skin surface so that the drug could reach the fungal elements [23], with or without lower incidence of side effects.

In this context, this paper reports the design of innovative lipid nanoparticles and discusses their feasibility by high-pressure homogenization. Tioconazole-loaded mangospheres (MGS) prepared with mango butter containing or not *Melaleuca alternifolia* (tea tree) essential oil (TTO) were proposed, considering that the natural lipid (mango butter) has anti-inflammatory and healing properties [6] and that TTO has antimicrobial, anti-inflammatory and healing recognized activities [24, 25]. In this way, the solid and liquid lipids act simultaneously as carrier and drug. Thus, our Mangospheres may offer controlled and targeted drug delivery and improvements in drug physicochemical properties, combined with the healing, antioxidant and antimicrobial properties of the natural lipids (solid and liquid) used. In order to obtain an appropriate dosage form with adequate consistency, compatible with topical use, hydrogels were produced using the liquid dispersion of mangospheres as an intermediate product. Furthermore, the influence of adding TTO or not to MGS was evaluated in terms of skin retention using porcine skin.

## 2. Material and Methods

### 2.1 Materials

Mango butter (Pharma Special, Santana de Parnaíba, Brazil) was used as solid lipid, while tea tree oil (Lazlo Aromaterapia, Belo Horizonte, Brazil) was used as liquid lipid. Tioconazole was supplied by Pharmanostra (Rio de Janeiro, Brazil). Sorbitan monooleate was acquired from Sigma (São Paulo, Brazil) and polysorbate 80 and triethanolamine from Delaware (Porto Alegre, Brazil). All other chemicals and solvents were of pharmaceutical grade and were used as received. *Candida albicans* ATCC10231 was kindly donated by Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde (INCQS – FIOCRUZ, Rio de Janeiro, Brazil). For preparation of the hydrogels, Carbopol®Ultrez (acrylic acid polymer) was purchased from Deg (São Paulo, Brazil).

### 2.2. Methods

#### 2.2.1. Preparation of Mangospheres dispersions and hydrogels

TIO-MGS and TIO-TTO-MGS were prepared by the high-pressure homogenization technique [3, 8, 26]. A pre-emulsion was prepared adding the aqueous phase containing polysorbate 80 (2.5%, w/w) to the melted hydrophobic phase containing the mango butter (7%, w/w), TTO (3%, w/w) (for TTO-MGS), sorbitan monooleate (1.5, % w/w), butylated hydroxytoluene (BHT- 0.05%, w/w) and tioconazole (0.2, % w/w) in an UltraTurrax (24000 rpm; IKA Works, Brazil). This pre-emulsion was then subjected to high-pressure homogenization (six cycles at 500 bar) (Panda 2K NS 1001L, GEA NiroSoavi, Italy). As a control, blank formulations were prepared without the azole antifungal drug (TIO) and named MGS or TTO-MGS. It should be noted that prior to optimization of these parameters, pre-formulation studies were performed, in which we evaluated different proportions of raw materials, as well as number of cycles and pressure. The most appropriate formulations were

chosen based on the evaluation of formulations by laser diffraction (Malvern Mastersizer<sup>®</sup>2000, Malvern Instruments, UK).

The semisolid formulations were prepared by dispersing Carbopol<sup>®</sup> Ultrez (0.5%, w/w) in aqueous dispersions of TIO-MGS, TIO-TTO-MGS, MGS, and TTO-MGS (50 ml) with a mortar and pestle (n=3) and were named HG-TIO-MGS, HG-TIO-TTO-MGS, HG-MGS, and HG-TTO-MGS, respectively. In addition, a hydrogel containing non-encapsulated tioconazole was prepared using its hydroethanolic solution, at the same concentration used for the colloidal systems (HG-TIO). A hydrogel base (without the drug and nanoparticles) was also prepared. All dispersions were neutralized with triethanolamine (0.1%, w/w) to obtain an adequate semisolid consistency. All formulations were prepared in triplicate batches.

## *2.2.2. Characterization of colloidal systems*

### *2.2.2.1. Determination of particle size distribution, zeta potential and pH*

The particle size (z-average) and polydispersity index (PDI) of each formulation were determined through photon correlation spectroscopy (PCS; ZetasizerNano ZS, Malvern Instruments, UK) after dilution (500x) in purified water. To rule out the simultaneous presence of a micrometric population in the sample, laser diffraction analysis were carried out (Malvern Mastersizer<sup>®</sup>2000, Malvern Instruments, UK) inserting the sample directly in the wet unit of the equipment.

Zeta potentials of tioconazole-loaded Mangospheres and control formulations were also determined using a ZetasizerNano ZS by measuring electrophoretic mobility. In this case, the samples were diluted (500x) in a 10 mM sodium chloride solution. All analysis were carried out in triplicate.

pH values were measured directly in Mangospheres aqueous dispersion using a pre-calibrated potentiometer (Seven Easy, Mettler Toledo, Brazil).

#### 2.2.2.2. Nanoparticle tracking analysis (NTA)

In order to identify and track individual nanoparticles moving under Brownian motion, and for visualization of TIO-MGS and TIO-TTO-MGS, nanoparticles tracking analysis were performed (NanoSight LM 10; NTA 2.2 Analytical Software, Nanosight Ltd., Amesbury, UK). After appropriate dilution in purified water (5000x), the samples were measured for 60 s, at room temperature. This technique is based on the combination of light scattering microscopy with visualization and recording of nanoparticles through a charge-coupled device camera (CCD) [27].

#### 2.2.2.3. Morphological analysis

Mangospheres formulations (TIO-MGS and TIO-TTO-MGS) were submitted to morphological analysis by transmission electron microscopy (TEM; Jeol, JEM 1200 Exll, *Centro de Microscopia – UFRGS*), operating at 80 kV. The samples were diluted and deposited in Form-Carbon support films on a specimen grid (Electron Microscopy Sciences, USA), negatively stained with uranyl acetate solution (2% w/v) and observed under 150,000x magnification.

#### 2.2.2.4. Multiple light scattering analysis

Predictive physical stability of liquid formulations, such as colloidal suspensions, can be evaluated by multiple light scattering analyses, enabling the prior and easy detection of possible instability phenomena [28]. The physical stability of all formulations was evaluated by multiple light scattering analyses (Turbiscan Lab, Formulacion, France). Formulations (20 ml) were placed in a cylindrical glass cell and scanned by an infrared ray every 5 min for 1 h, and backscattering and transmission data were recorded.

#### 2.2.2.5. X-ray diffraction analyses

In order to evaluate the crystallinity of Mangospheres, the diffraction of solid material were conducted with a D500 x-ray diffractometer (Siemens, Germany) (CuK $\alpha$  radiation at 35 kV). The analyses were performed for the raw material (Mango butter and tioconazole) and for previously dried Mangospheres (dried at room temperature).

#### 2.2.2.6. Drug content and encapsulation efficiency

Tioconazole content and encapsulation efficiency were evaluated by liquid chromatography (HPLC-UV, Shimadzu, Japan) according to a previously validated method [29]. A solution of methanol: water (80:20, v/v) at pH 11.0, adjusted with ammonia hydroxide, was used as the mobile phase at a flow of 1.0 ml min<sup>-1</sup>. The column used was a Gemini C18, 150 mm (Phenomenex, USA). The wavelength was 219 nm and the volume of sample injection was 20  $\mu$ L. To determine the drug content, an aliquot of TIO-MGS and TIO-TTO-MGS was added to methanol followed by 30 min of ultrasonication and filtration (n=3). The same procedure was performed to determine TIO in the hydrogels. To calculate encapsulation efficiency, free tioconazole was separated from the lipid particles by ultrafiltration centrifugation (Ultrafree-MC 10 000 MW, Merck Millipore, Germany) at 5000 rpm for 7 min at 25 °C, and then assayed by liquid chromatography according to the method described above.

#### 2.2.2.7. Drug release studies

The studies on *in vitro* drug release from TIO-MGS and TIO-TTO-MGS were performed (in triplicate) using the dialysis bag method. The experiment was carried out using a filtered water: ethanol (70:30) solution at 37 °C as the medium. The dialysis bag (MWCO = 12,000 to 14,000 Da, Sigma-Aldrich Corporation, USA) containing 1.5 ml of sample was

placed in contact with 150 ml of release medium under moderate and constant stirring (ensuring sink conditions). At pre-determined time intervals, 1 ml of the external medium was withdrawn and replaced with the same volume of fresh medium. Tioconazole concentration was assayed by HPLC, under the conditions described in section 2.2.2.6., using a sample injection volume of 40  $\mu\text{L}$ , for which an analytical curve was prepared using the same release medium. Data were analyzed using mathematical modeling (MicroMath<sup>®</sup> Scientist<sup>®</sup> for Windows<sup>™</sup>) in order to obtain a better understanding of the behavior of tioconazole release from lipid colloidal nanoparticles. The selection of the model that best described the release profiles was based on the correlation coefficient ( $r$ ), model selection criteria (MSC) and graphic adjustment. For comparison purposes, the diffusion of non-encapsulated tioconazole from a hydroethanolic solution (50:50 v/v) at the same concentration was also evaluated. Three independent experiments were performed for each formulation.

### 2.2.3. In vitro antifungal activity of TIO-MGS and TIO-TTO-MGS against *Candida albicans*

The antifungal activity was investigated to ensure that the process of obtaining TIO-MGS and TIO-TTO-MGS did not interfere with the efficacy of tioconazole. The antifungal activity of the nanosystems against *Candida albicans* (ATCC 10231) was compared with that of the non-encapsulated drug through the agar well diffusion method (n=6). The yeast suspension with a cell density of  $1.6 \times 10^7$  CFU  $\text{ml}^{-1}$  was placed (1%) in an Erlenmeyer flask containing sabouraud dextrose agar (SDA, Merck, São Paulo, Brazil). Inoculated agar (5 ml) was transferred to the surface of SDA plates. Then, 9-mm wells (in diameter) were made with aid of a sterile punch. Aliquots of 100  $\mu\text{L}$  of each formulation solution ( $2 \mu\text{g ml}^{-1}$ ) were placed in the wells. The plates were incubated at  $35 \pm 2^\circ\text{C}$  for 24 h, when inhibitions zones were measured (in mm) with aid of a digital caliper (Starrett, Brazil). As control, formulations without the drug and the same solvent used in tioconazol solution were also evaluated.

#### 2.2.4. Characterization of hydrogels

Physicochemical characteristics of hydrogels containing tioconazole-loaded mangospheres were evaluated after preparation and after 30 days.

##### 2.2.4.1. Macroscopic characteristics and pH

The macroscopic characteristics (visual aspect, odor, and color) of the hydrogels were observed. pH values were determined in a dispersion of the hydrogel in ultrapure water (10%, w/v) using a calibrated potentiometer (Mettler Toledo, Barueri, Brazil) at room temperature (n= 3).

##### 2.2.4.2. Evaluation of particle size

After dilution, redispersion and filtration (Quanty JP41, 80 g m<sup>-2</sup>; 28 µm, J Prolab, São José dos Pinhais, Brazil) of an aliquot of each hydrogel in purified water (500x), the presence of Mangospheres in the semisolid was evaluated. Analyses were performed by PCS (ZetasizerNano ZS), in triplicate.

##### 2.2.4.3. In vitro skin retention study

The skin retention study was carried out using automated Franz cells (MicroettePlus Multi Group®, Hanson Research Corporation, Germany) and porcine skin as a membrane. The receptor medium was a solution of water: ethanol (60: 40 v/v) (ensuring sink conditions) at 37 °C under constant stirring at 400 rpm. Female porcine skin samples were obtained from a slaughterhouse (Frigorífico Araldi, Brazil). Adipose tissue and hair were removed and the skin was cleaned with an aqueous solution (2%) of sodium lauryl sulfate on the internal surface and with an ethanol: ether (1:1, v/v) solution on the external surface. The skin was cut

into 3-cm pieces (in diameter), whose thickness was measured with a dial thickness gage 7301<sup>®</sup> (Mitutoyo, São Paulo, Brazil). Only samples of 1.7 to 2.0 mm in thickness were used.

Around 300 mg of each hydrogel was applied (infinite dose) onto a skin area of 1.76 cm<sup>2</sup>. At the end of an 8-h period, the automatic collection of the receptor medium (1 ml) was carried out, the pieces of skin were carefully removed from the apparatus and the excess of formulation removed. The stratum corneum was removed by the tape stripping technique (Scotch tape 3M<sup>®</sup>, Brazil) with 18 tapes (6 tapes in 3 test tubes containing 6 ml of acetonitrile). The viable epidermis and dermis were separated with a spatula after heating the skin in a water bath at 60 °C for 1 min. The dermis was cut into small pieces with a scalpel aid. Dermis and epidermis were placed in separate test tubes containing 1 ml and 3 ml of acetonitrile, respectively. The solvent extraction of tioconazole was carried out by vortexing for 2 min followed by 30 min of ultrasonication (25 kHz). The extraction procedure was previously validated and 100% of drug recovery from the skin was obtained. The samples were collected automatically and filtered (regenerated cellulose membrane, 0.45 µm, Sartorius<sup>®</sup>, Germany) directly into vials before injection (40 µl) into the HPLC instrument. The analysis was carried out under the same analytical conditions described in section 2.2.2.6. Since this is a bioanalytical analysis, the method was validated according to the Guidance for Industry, Bioanalytical Method Validation [30]. Six independent experiments were performed for each formulation.

### 2.5. Statistical analysis

All formulations were prepared and analyzed in triplicate. Results are expressed as mean ± SD (standard deviation). Data were analyzed by one-way ANOVA followed by the Tukey test, at a significance level of 5%. Skin retention studies data are expressed as mean ± S.E.M (standard error).

### 3. Results and Discussion

#### 3.1. Production of Mangospheres

After preparation, all liquid formulations presented macroscopic homogeneous appearance and slightly acidic pH (Table 1). The mean diameters determined by PCS were  $109 \pm 1$  nm for TIO-MGS and  $93 \pm 1$  nm for TIO-TTO-MGS, with values for the polydispersity index of 0.07 and 0.11, respectively (Table 1). These values lower than 0.20 indicates the adequate homogeneity of the systems. No statistical differences ( $p > 0.05$ ) between the particle diameters of TIO-MGS and TIO-TTO-MGS were observed, demonstrating that the presence of the liquid lipid (in this case TTO) does not influence the mean particle size, as well as the presence of tioconazole. Similar physicochemical parameters have been observed in a previous study by Souza et al. [31], where no difference between particle sizes for other lipid nanoparticles (NLC and SLN) using stearic acid and oleic acid as the solid and liquid lipid, respectively. Laser diffraction analysis evidenced a monomodal particle size distribution only at the nanometric scale (Fig. 1). Furthermore, about 74% of the particles for TIO-MGS and 82% for TIO-TTO-MGS were below 100 nm. These results are in agreement with the concept of nanomaterials by the European Commission [32], which considers nanomaterials the systems that show more than 50% of particles in the number size distribution between 1 and 100 nm. The absence of micrometric particles in these formulations and the monomodal particle distribution indicate the adequate qualitative and quantitative composition of the formulations as well as the suitability of the operational conditions employed for the production of the lipid particles by high-pressure homogenization to achieve efficient control of the particle size. Zeta potential values were negative (Table 1), which can be explained by the nature of the raw materials used, as mango butter is rich of fatty acids (saturated and unsaturated). The presence of tioconazole led a reduction ( $p \leq 0.05$ ) in potential zeta values. NTA analysis also showed nanometric particles with an average size

of 104 nm for TIO-TTO-MGS and 117 nm for TIO-MGS. This complementary analysis to photon correlation spectroscopy combines the advantages of transmission electron microscopy (that considers single particle) and photon correlation spectroscopy (evaluates the number of particles), in the determination of the average particle diameter [27]. NTA results corroborated with those presented by PCS. Morphological analysis (TEM) showed homogeneous and spherical particles with diameters similar to those measured by other techniques (Fig. 2).

*Please, insert Table 1 here*

Multiple light scattering analysis of Mangospheres produced, with or without the drug showed that all profiles cut through the backscattering (BS = 0%) line at the same point, indicating no change in particle size. MGS formulations presented a slow decrease in backscattering (lower than 2%) at the bottom of the glass cell due to a reduction of particle concentration (clarification), which indicates a small tendency to creaming. For TTO-MGS formulations, it was observed a slightly increase in backscattering at the bottom due to sedimentation phenomena, however, it was also observed a tendency of creaming, both lower than 5%. It is important to emphasize that both creaming and sedimentation phenomena are reversible. Reversible and irreversible destabilization phenomena can be predicted for a formulation via multiple light scattering analysis. Variations in the backscattering of  $\pm 2\%$  in the middle part of the graph are not considered to reflect significant changes in the particle size, and variations above 10% at the edges of the graph indicate that these are unstable formulations [28].

MGS and TTO-MGS formulations showed lower peak intensities compared to their respective raw materials (Mango butter and tioconazole), indicating a decrease in the

crystallinity. Furthermore, comparing both formulations (MGS and TTO-MGS, whose intensity peaks were 190 Lin Counts and 150 Lin Counts, respectively) (data not shown). It could be observed a decrease in the intensity peaks for TTO-MGS, suggesting the lower lipid crystallinity for this formulation due to the presence of the liquid oil, as previously observed for lipid nanoparticles (SLN) and nanostructured lipid carriers (NLC) [1, 5].

### *3.2. Drug content and encapsulation efficiency*

Regarding the total content of tioconazole in the formulation, recoveries of around 87% and 82% (Table 1) of the initial amount of drug added were observed for TTO-MGS and MGS, respectively. Higher amounts of drug content were found for clotrimazole-loaded NLC (97%), however, in this case a different preparation method was used, the ultrasonication [18]. Values lower than 90% can be explained by losses of the drug that may occur during the nanoparticle preparation process, where some of the drug may adhere to the experimental apparatus [31].

The encapsulation efficiencies of tioconazole-loaded TTO-MGS and MGS were above 99%, regardless of the type of lipid nanoparticles (Table 1). It is important to infer that, at the concentrations used in the preparation of TIO-TTO-MGS, the drug is completely soluble in the oil. Previous reports have described lower encapsulation efficiencies for similar drugs: around 70% and 65% [33] and 85% and 83% [17] for clotrimazole encapsulation in NLC and SLN, respectively, and around 75% and 80% for fluconazole in SLN and NLC, respectively [34]. The authors attribute the difference in the rate of association between different systems (SLN and NLC) to the presence of the liquid lipid. However, the high tioconazole encapsulation efficiency found in the study reported herein (close to 100%), for both MGS and TTO-MGS, can be explained by differences in the lipids employed, in which the melting point is lower, with lower crystallinity, and thus, more space to accommodate the drug;

besides the characteristics of tioconazole, which seem to be suitable for incorporation of the drug into these lipid nanosystems.

### 3.3. Drug release studies

To evaluate the control of tioconazole release by the systems developed, *in vitro* release studies were carried out over 30 h. The results are shown in Fig. 3 and reveal that tioconazole release from TIO-MGS and MGS occurs in two release phases over 30 h, while the non-encapsulated drug diffuses (around 100%) through the dialysis bag within 4 h. At the end of 30 h, the release of tioconazole from the lipid formulations was approximately 70% for MGS and 50% for TIO-MGS ( $p \leq 0.05$ ). The nanostructured formulations showed similar levels of tioconazole release during the first 12 h of the experiment ( $p > 0.05$ ); however, differences between the cumulative release of tioconazole from TIO-MGS and TIO-TIO-MGS occurred at 24 h and 30 h during the experiment ( $p \leq 0.05$ ). Souto and co-workers [33] found that the release of clotrimazole from SLN and NLC was between 20 and 30% after 24h. In addition, no difference between on rates of clotrimazole release from different lipid nanoparticles was observed by Das and co-workers [17], using the same drug to lipid ratio. The faster release of tioconazole from MGS can be explained by the structure of this type of particle. SLN are structurally more organized and at least part of the solid lipid can be present in the crystalline form, leading to the release of the drug (in this case, TIO-MGS formulations presented loss in crystallinity with the presence of TIO compared with MGS formulations, as previously showed by x-ray analyses). On the other hand, NLC is less organized, allowing the drug to be arranged in clusters, preventing or reducing the release of the drug [5].

Release data were modeled using zero-order, monoexponential and biexponential equations. The profile for the release of tioconazole from the Mangospheres followed a first order model with biexponential kinetics with best fit  $r$  and MSC values of  $0.9967 \pm 0.0006$

and  $4.2473 \pm 0.1776$  for TIO-MGS and  $0.9949 \pm 0.0030$  and  $3.9109 \pm 0.5491$  for TIO-TTO-MGS, respectively. The release of tioconazole in the first phase (*a*) was around 63% for TIO-MGS and 56% for TIO-TTO-MGS, while the rate constants calculated for this phase ( $k_1$ ) were  $0.1357 \pm 0.0051 \text{ h}^{-1}$  and  $0.1401 \pm 0.0421 \text{ h}^{-1}$  for TIO-MGS and TIO-TTO-MGS, respectively. The initial concentrations of tioconazole that contributed to the second phase release (*b*) was around 39% and 55% of the total drug content at a release rate ( $k_2$ ) of  $0.0092 \pm 0.0066 \text{ h}^{-1}$  and  $0.0063 \pm 0.0058 \text{ h}^{-1}$  for TIO-MGS and TIO-TTO-MGS, respectively. The MGS formulation released higher amounts of tioconazole in the first phase (63%) than the TIO-MGS (56%); however, the rate was the same for the two formulations. For the second phase, the amount of tioconazole released from MGS was lower and the release rate was faster compared with TIO-MGS. The results demonstrated the effectiveness of these systems, particularly the TIO-MGS, in the controlled release of tioconazole.

#### 3.4. In vitro antifungal activity of TIO-MGS and TIO-TTO-MGS

The antifungal activity of TIO-loaded MGS and TIO-MGS is shown in Fig. 4. The diameters of inhibition zones were  $24.18 \pm 0.29 \text{ mm}$ ,  $26.75 \pm 0.55 \text{ mm}$  and  $28.75 \pm 2.33 \text{ mm}$  for TIO-MGS, TIO-TTO-MGS and TIO, respectively ( $p \leq 0.05$ ). The blank formulations either the hydroethanolic solution did not present inhibition zones, demonstrating that the constituents did not affect the microorganism growth. The effect of the nanostructure on the growth of *C. albicans* showed that the incorporation of tioconazole into the nanostructured lipid systems did not cause a loss in the antifungal activity. In order to gain a better understanding, non-encapsulated tioconazole free in solution (TIO) was used as a reference, assigned as 100% antifungal activity. Compared with the nanocarriers, the values for the activity of TIO-TTO-MGS and TIO-MGS were 93 and 84%, respectively. These results are satisfactory and demonstrate the maintenance of the drug activity after the preparation of

nanocarriers. In addition, the higher activity of the TIO-TTO-MGS can be related to the presence of tea tree oil, exerting a synergistic effect against the yeast. It should be noted that the larger zones of inhibition observed for free drug (TIO) may also be related to the greater diffusion in the culture medium.

### 3.5. Production of hydrogels

The incorporation of Mangospheres into hydrogels led to obtainment of semisolid formulations with satisfactory organoleptic characteristics, such as a bright and homogeneous aspect and white color. The hydrogels containing the nanostructured lipid carrier (HG-TIO-TTO-MGS and HG-TTO-MGS) presented an odor characteristic of melaleuca oil.

All formulations showed slightly acidic pH values (around 5.5 to 5.7), which are in agreement with those required for topical formulations [35]. The drug content of the hydrogels was similar to the original liquid formulation, resulting in a drug recovery of close to 100 % ( $1.77 \pm 0.01 \text{ mg ml}^{-1}$ ,  $1.74 \pm 0.02 \text{ mg ml}^{-1}$  and  $1.99 \pm 0.02 \text{ mg ml}^{-1}$ , for HG-TIO-TTO-MGS, HG-TIO-MGS and HG-TIO, respectively).

In order to evaluate the physical stability of nanoparticles in the semisolid formulations, a photon correlation spectroscopy study was conducted with the hydrogels redispersed in water ( $n=3$ ). The results verified that the incorporation of liquid dispersions of the lipid nanoparticles into the hydrogels did not affect the nanostructural integrity. The particle sizes after incorporation were  $161 \pm 7 \text{ nm}$  (HG-TIO-MGS),  $143 \pm 21 \text{ nm}$  (HG-TIO-TTO-MGS),  $142 \pm 8 \text{ nm}$  (HG-MGS) and  $93 \pm 6 \text{ nm}$  (HG-TTO-MGS). Increases in the mean particle size were observed for all formulations ( $p \leq 0.05$ ). These results are in agreement with those of previous studies, where an increase in the mean size of lipid nanoparticles was observed after incorporation into hydrogels [36, 37] due to the presence of a gelling agent, which could hinder the adequate dispersion of the nanoparticles [38].

After 30 days of storage, protected from light and at room temperature, the hydrogels containing tioconazole-loaded Mangospheres showed stable. pH values were slightly acidic (5.4-5.5) and drug content of  $1.75 \pm 0.02 \text{ mg mL}^{-1}$ ,  $1.74 \pm 0.03 \text{ mg mL}^{-1}$  and  $1.95 \pm 0.03 \text{ mg mL}^{-1}$  for HG-TIO-TTO-MGS, HG-TIO-MGS and HG-TIO, respectively. Mean particle size remained in the nanometric scale, with no significant changes ( $167 \pm 10 \text{ nm}$ ,  $145 \pm 19 \text{ nm}$ ,  $139 \pm 12 \text{ nm}$  and  $100 \pm 9 \text{ nm}$ , for HG-TIO-MGS, HG-TIO-TTO-MGS, HG-MGS, and HG-TTO-MGS, respectively).

### 3.7. In vitro skin retention studies

In order to evaluate the distribution of tioconazole in the different skin layers after the administration of the semisolid formulations, an *in vitro* skin retention study was carried out. The data are shown in Fig. 5. After 8 h of study, tioconazole was not detected in the receptor medium, indicating that this imidazolic antifungal drug did not permeate through porcine skin after the topical application. However, variations in the amount of tioconazole in the different skin layers were observed by comparison of the formulations containing the drug-loaded lipid nanoparticles with the control formulation containing non-encapsulated tioconazole. For the outermost skin layer, i.e., stratum corneum, the values of retained amount of TIO obtained for all formulations were statistically similar ( $p > 0.05$ ) ( $18.66 \pm 3.63 \mu\text{g cm}^2$ ,  $12.29 \pm 2.37 \mu\text{g cm}^2$  and  $10.24 \pm 3.34 \mu\text{g cm}^2$  for HG-TIO, HG-TIO-TTO-MGS, and HG-TIO-MGS, respectively). For the formulation containing the non-encapsulated, drug a significantly ( $p \leq 0.05$ ) higher amount of tioconazole was observed in epidermis and dermis ( $10.26 \pm 3.08 \mu\text{g cm}^2$  and  $9.32 \pm 5.87 \mu\text{g cm}^2$ , respectively) compared to the formulation containing the drug-loaded lipid nanoparticles. For the nanoparticle formulations HG-TIO-TTO-MGS and HG-TIO-MGS, the values for the amount of tioconazole retained in the epidermis were  $1.73 \pm 0.74 \mu\text{g cm}^2$  and  $1.9 \pm 0.77 \mu\text{g cm}^2$ , respectively, and in the dermis the corresponding values were  $1.18 \pm 0.12$

$\mu\text{g cm}^2$  and  $1.03 \pm 0.24 \mu\text{g cm}^2$ . These values demonstrate that a much greater amount of tioconazole released from HG-TIO reached the deeper skin layer, when compared to the hydrogels containing the lipid nanoparticle carriers.

The effect of controlling drug release plays important role in drug distribution in stratum corneum and deeper skin layers, since this distribution is influenced by the amount of drug released [39]. Taking into account the results obtained in the *in vitro* release studies (dialysis bag), showing 100% of tioconazole release from solution during the first 6 h and only 40% of tioconazole release from Mangospheres during the first 8 h. It could be inferred that almost all of drug released from hydrogels containing the lipid colloidal systems was retained at stratum corneum. On the other hand, for hydrogels containing non-associated drug, a significant part of TIO was quantified in the deeper layers. It is important to emphasize that nanostructured tioconazole were not statistically different ( $p>0.05$ ) as that of the non-nanostructured compound in stratum corneum. A previous *in vivo* study using guinea pigs on the percutaneous absorption after topical administration of 1% tioconazole cream and 1% tioconazole solution showed the permanence of a greater amount of drug in the stratum corneum. However, percutaneous absorption for both formulations as well as a high retention of the drug in the epidermis and dermis, while negligible amounts of the drug were quantified in plasma [40]. It has been reported that low dermal absorption occurs even when high concentrations of tioconazole are employed [41]. Therefore, our results agree with previously reported findings. Gupta and Vyas [34] showed similar higher retention of fluconazole in stratum corneum and low concentration in dermis and epidermis when lipid nanoparticles were studied. In our experiment, after 8 h, it was not possible to quantify TIO in the receptor; however, for HG-TIO, high amounts of the drug were quantified in the deeper layers (epidermis and dermis). For hydrogels containing Mangospheres, quantification of TIO was limited to the stratum corneum. These systems may act as reservoirs in the upper skin layer,

prolonging skin residence of the drug, due to the limiting effect of the lipid present in Mangospheres on drug permeation.

Different results have been published showing drug retention in deeper layers of skin [42, 43]. Montenegro et al. [39] showed retention of idebenone in different layers of skin, depending on the formulation. Lipid nanoparticles have the advantage of targeting the drug to the skin layers of interest, to promote the desired effect with reduced side effects. This flexibility on targeting drugs could be achieved by the choice of formulation components. Dermatophyte fungi have predilection for keratinized tissues and superficial infections occur mainly in the stratum corneum. The retention of the drug in this layer, promoted by Mangospheres, directs the treatment towards the site of infection, minimizing the chance of adverse reactions, such as contact dermatitis, which occurs when the drug comes into contact with the innermost layers of the cutis. Thus, Mangospheres may confer a better performance to treat superficial mycosis, since they present TTO, with antifungal activity, which may act in synergism with tioconazole (as shown in section 3.4) to combat the infection. Moreover, antioxidative, anti-inflammatory and healing properties of mango butter could improve or accelerate skin recovery from injury caused by infection.

#### **4. Conclusions**

This is the first study to demonstrate the feasibility of producing tioconazole-loaded Mangospheres (MGS and TTO-MGS) using innovative materials applied in nanometric colloidal lipid systems (mango butter and TTO) and controlled drug release properties. The nanoparticle preparation process does not adversely affect the activity of the antifungal drug. The semisolid prepared with the lipid nanoparticles ensured the permanence of the drug in the stratum corneum of porcine skin, targeting the specific site of superficial fungal infection.

These innovative formulations are potential candidates for the treatment of this cutaneous infection.

### **Acknowledgments**

The authors thank Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS), CNPq and CAPES for the financial support. F. C. F. thanks CAPES for her fellowship.

## References

- [1] R. H. Müller, M. Radtke, S.A. Wissing, *Adv. Drug. Deliver. Rev.* 1, S131 (2002).
- [2] N. Anton, J. P. Benoit, P. Saulnier P, *J. Control. Release.* 128, 185 (2008).
- [3] M. Schäfer-Korting, W. Mehnert, H. C. Korting, *Adv. Drug. Deliver. Rev.* 59, 427 (2007).
- [4] R.H. Müller, R. D. Petersen, A. Hommoss, J. Pardeike, *Adv. Drug. Deliver. Rev.* 59 522 (2007).
- [5] J. Pardeike, A. Hommoss, R. H. Müller, *Int. J. Pharm.* 366, 170 (2009).
- [6] S. D. Mandawgade and V. B. Patravale, *Int. J. Pharm.* 363, 132 (2008).
- [7] I. Lacatusu, N. Badea, G. Badea, O. Oprea, M.A. Mihaila, D.A. Kaya, R. Stan, A. Meghea, *Mat. Sci. Eng. C.* 56 88, (2015).
- [8] L. M. Colomé, R. P. Raffin, E. R. Assumpção, A. R. Pohlmann, S. S. Guterres, *Soft. Mater.* 8, 72 (2010).
- [9] J. Garg, R. Tilak, A. Garg, P. Prakash, A. K. Gulati, G. Nath, *BioMedicalCenter Research Notes* 2, 1(2009).
- [10] N. M. Martinez-Rossi, N. T. A. Peres, A. Rossi, *Mycopathologia* 166, 369 (2008).
- [11] J. J. C. Sidrim and M. F. G. Rocha in *Micologia medica a luz de autores contemporâneos*, edited Guanabara Koogan S.A. Copyright, Rio de Janeiro (2004), Chapter 1.
- [12] B. Brennan and J. J. Leyden, *J. Am. Acad. Dermatol.* 36, 3 (1997).
- [13] I. P. Kaur and S. Kakkar, *Expert Opin. Drug Del.* 1 (2010).
- [14] S. Kamiya, T. Kurita, A. Miyagishima, S. Itai, M. Arakua, *Eur. J. Pharm. Sci. Biopharm.* 74, 461 (2010).
- [15] J. Pardeike, S. Weber, T. Haber, J. Wagner, H.P. Zarfl, H. Plank, A. Zimmer, *Int. J. Pharm.* 419, 329 (2011).
- [16] E. B. Souto and R.H. Müller, *J. Microencapsulation*, 22, 501 (2005).

- [17] S. Das, W. Kiong, R. B. H. Tan, Eur. J. Pharm. Sci. 47, 139 (2012).
- [18] E. Esposito, L. Ravani, C. Contado, A. Costenaro, M. Drechsler, D. Rossi, E. Menagatti, A. Grandini, R. Cortesi, Mat. Sci. Eng. C. 33, 411 (2013).
- [19] S. Jervons, G. E. Gymer, K. W. Brammer, D.A. Cox, M.G. Leeming, Antimicrob. Agents and Chemother. 5, 597 (1979).
- [20] R. A. Fromtling, Clin. Microbiol. Rev. 1, 187 (1988).
- [21] W. H. Beggs, Antimicrobial Agents Chemoth. 699 (1984).
- [22] S. Stubb, H. Heikkilä, S. Reitamo, L. Förström, Contact Dermatitis. 26, 155 (1992).
- [23] M. A. Repka, P. K. Mididoddi, S. P. Stodghill, Int. J. Pharm. 282, 95 (2004).
- [24] C. F. Carson, K. A. Hammer, T. V. Riley, Clin. Microbiol. Rev. 19, 50 (2006).
- [25] F. C. Flores, J. A. de Lima, C. R. da Silva, D. Benvegnú, J. Ferreira, M. E. Burger, R. C. R. Beck, C. M. B. Rolim, M. I. U. M. Rocha, M. L. da Veiga, C. B. da Silva, J Nanosci. Nanotechnol. 14, 1 (2014).
- [26] R. H. Müller, K. Mäder, S. Gohla, Eur. J. Pharm. Biopharm. 50, 161 (2000).
- [27] V. Filipe, A. Hawe, W. Jiskoot, Pharm. Res. 39, 796 (2010).
- [28] C. Celia, E. Trapasso, D. Cosco, D. Paolino, M. Fresta, Colloid. Surface B. 72, 155 (2009).
- [29] A. P. G. Härter, M. H. Motta, J. G. Barros, R. F. Ribeiro, A. I. H. Adams, S. R. Schaffazick, C. B. Silva, Quim. Nova, 37, 996 (2014).
- [30] FDA, Guidance for Industry, Bioanalytical Method Validation. Food and Drug Administration 1 (2001) 22.
- [31] L. G. Souza, E. J. Silva, A. L. L. Martins, M. F. Mota, R. C. Braga, E. M. Lima, M. C. Valadares, S. F. Taveira, R. N. Marreto, Eur. J. Pharm. Biopharm. 79, 189 (2011).
- [32] European Commission, in *Official Journal of the European Union* 54, 30 (2011).
- [33] E. B. Souto, S. A. Wissing, C. M. Barbosa, R. H. Müller, Int. J. Pharm. 278, 71 (2004a).

- [34] M. Gupta and S. P. Vyas, *Chem. Phys. Lipids*. 165, 454 (2012).
- [35] S. Schreml, R. M. Szeimies, S. Karrer, J. Heinlin, M. Landthaler, P. Babilas, *J. Eur. Academy Dermat. Venereol.* 24, 373 (2010).
- [36] E. B. Souto, S. A. Wissing, C. M. Barbosa, R. H. Müller, *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 58, 83 (2004b).
- [37] M. Joshi and V. Patravale, *Int. J. Pharm.* 346, 124 (2008).
- [38] V. Sanna, G. Caria, A. Mariani, *Powder Technol.* 201, 32 (2010).
- [39] L. Montenegro, C. Sinico, I. Castangia, C. Carbone, G. Puglisi, *Int. J. Pharm.* 434, 169 (2012).
- [40] S. Sobue and K. Sekiguchi, *Biol. Pharm. Bull.* 27, 1428 (2004).
- [41] A. J. Carrillo-Muñoz, C. Tur-Tur, J. M. Hernández-Molina, P. Santos, D. Cárdenes, G. Giusiano, *Rev. Iberoam. Micol.* 27, 49 (2010).
- [42] J-Y. Fang, C-L. Fang, C-H. Liu, Y-H. Su, *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 70, 633 (2008).
- [43] G. Chen-Yu, Y. Chun-Fen, L. Qi-Iu, X. Yan-Wei, L. Wei-Na, Z. Guang-Xi, *Int. J. Pharm.* 430, 292 (2012).

Fernanda Cramer Flores

**LIPID NANOPARTICLES OBTAINED WITH INNOVATIVE NATURAL MATERIALS FOR TOPICAL DELIVERY OF TIOCONAZOLE: MANGOSPHERES**

**Table 1**

Table 1. Physicochemical characteristics of tioconazole-loaded mangospheres (TIO-MGS, TIO-TTO-MGS) and blank mangospheres (MGS and TTO-MGS) (n=3, mean  $\pm$  SD)

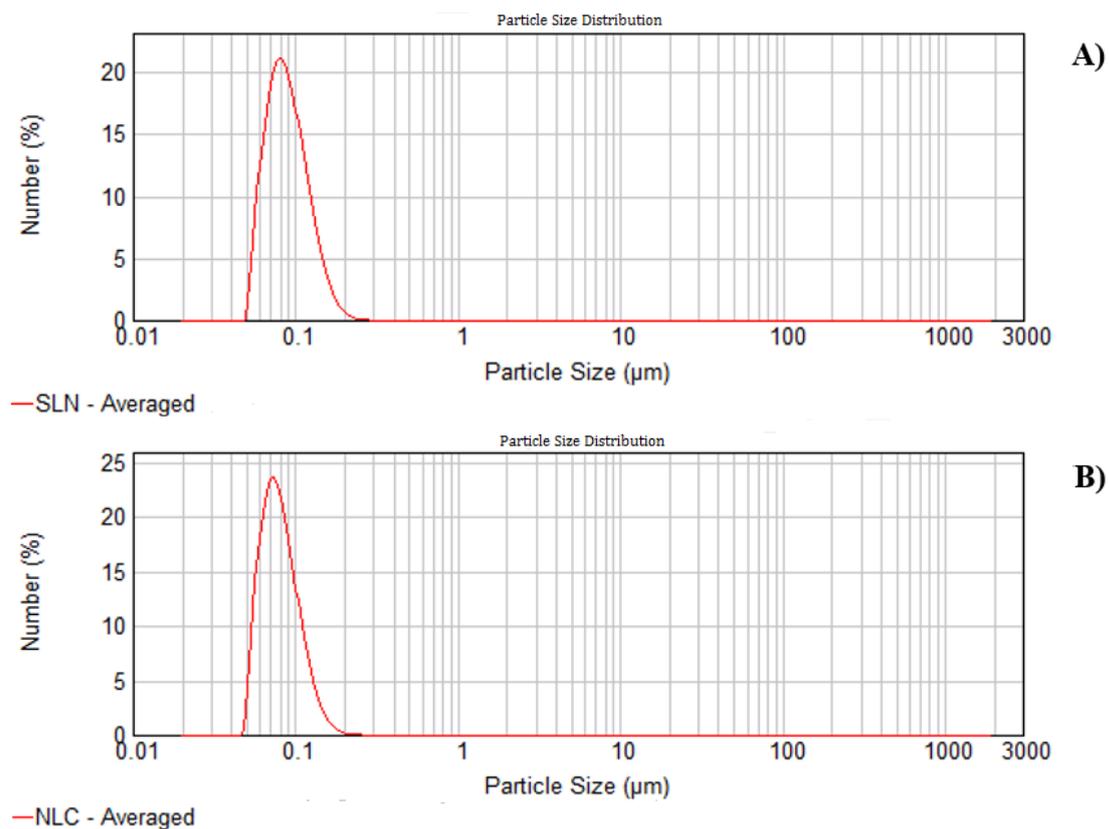
Formulation	Size (nm)	ZP (mV)	PDI	TIO content (mg mL <sup>-1</sup> )	EE (%)	pH
TIO-MGS	109 $\pm$ 1 <sup>a</sup>	- 6.1 $\pm$ 1.0 <sup>a</sup>	0.11 $\pm$ 0.02 <sup>a</sup>	1.64 $\pm$ 0.02 <sup>a</sup>	99.2 <sup>a</sup>	6.17 $\pm$ 0.12 <sup>a</sup>
MGS	92 $\pm$ 4 <sup>a</sup>	- 12.5 $\pm$ 2.8 <sup>b</sup>	0.13 $\pm$ 0.01 <sup>a</sup>	-	-	6.14 $\pm$ 0.15 <sup>a</sup>
TIO-TTO- MGS	93 $\pm$ 1 <sup>a</sup>	- 5.8 $\pm$ 0.9 <sup>a</sup>	0.07 $\pm$ 0.00 <sup>b</sup>	1.74 $\pm$ 0.01 <sup>a</sup>	99.5 <sup>a</sup>	5.39 $\pm$ 0.27 <sup>b</sup>
TTO-MGS	91 $\pm$ 5 <sup>a</sup>	- 11.3 $\pm$ 1.5 <sup>b</sup>	0.11 $\pm$ 0.02 <sup>a</sup>	-	-	5.44 $\pm$ 0.02 <sup>b</sup>

ZP: Zeta Potential; PDI: Polidispersion Index; EE: Encapsulation Efficiency. Different letters in the same column, are statistically different ( $p \leq 0.05$ ).

Fernanda Cramer Flores

## LIPID NANOPARTICLES OBTAINED WITH INNOVATIVE NATURAL MATERIALS FOR TOPICAL DELIVERY OF TIOCONAZOLE: MANGOSPHERES

**Figure 1**

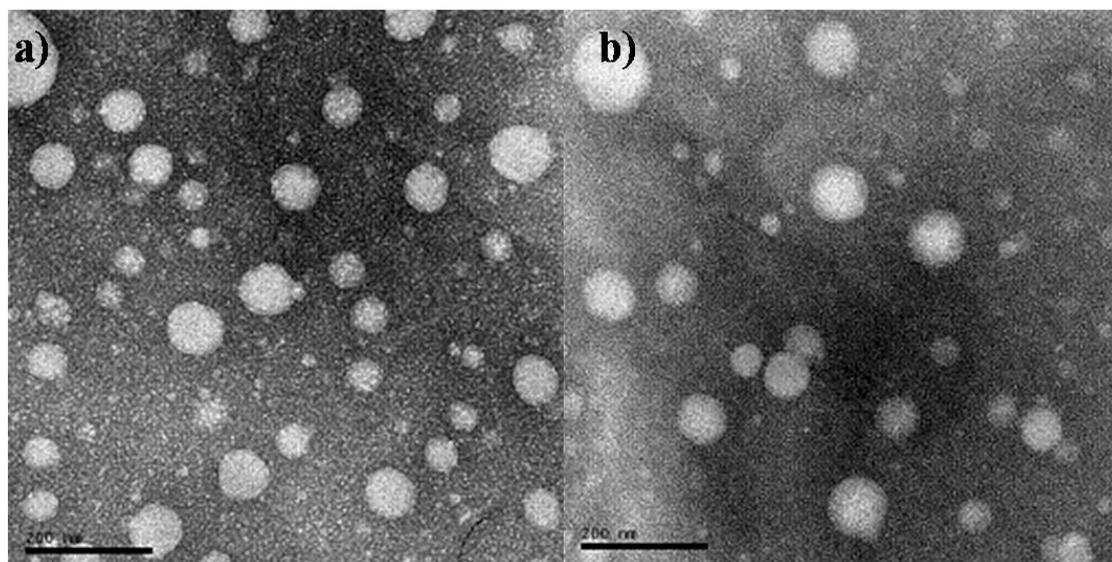


**Fig 1. Particle size distribution of (a) TIO-MGS and (b) TIO-TTO-MGS by Laser diffractometry**

Fernanda Cramer Flores

**LIPID NANOPARTICLES OBTAINED WITH INNOVATIVE NATURAL MATERIALS FOR TOPICAL DELIVERY OF TIOCONAZOLE: MANGOSPHERES**

**Figure 2**

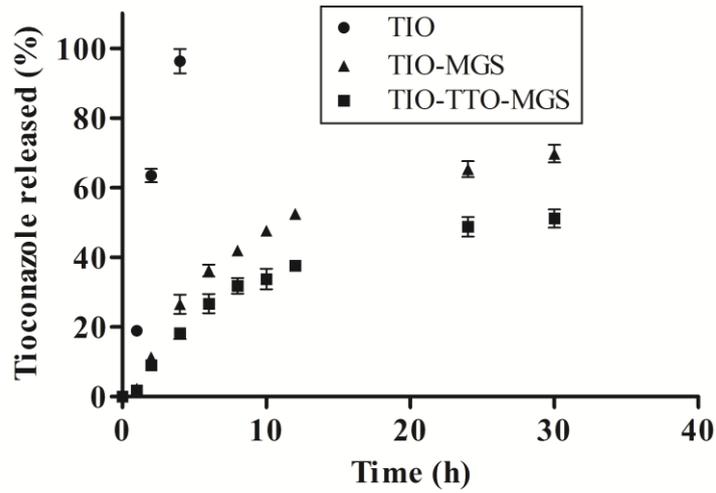


**Fig 2. TEM images of TIO-MGS (a) (150,000 x; bar = 200 nm) and TIO-TTO-MGS (b) (150,000 x; bar = 200 nm)**

Fernanda Cramer Flores

**LIPID NANOPARTICLES OBTAINED WITH INNOVATIVE NATURAL MATERIALS FOR TOPICAL DELIVERY OF TIOCONAZOLE: MANGOSPHERES**

**Figure 3.**



**Fig 3. Release profile of tioconazole from MGS and TTO-MGS aqueous suspension using dialysis bag. Data represent mean  $\pm$  SD (n = 3)**

Fernanda Cramer Flores

## LIPID NANOPARTICLES OBTAINED WITH INNOVATIVE NATURAL MATERIALS FOR TOPICAL DELIVERY OF TIOCONAZOLE: MANGOSPHERES

Figure 4.

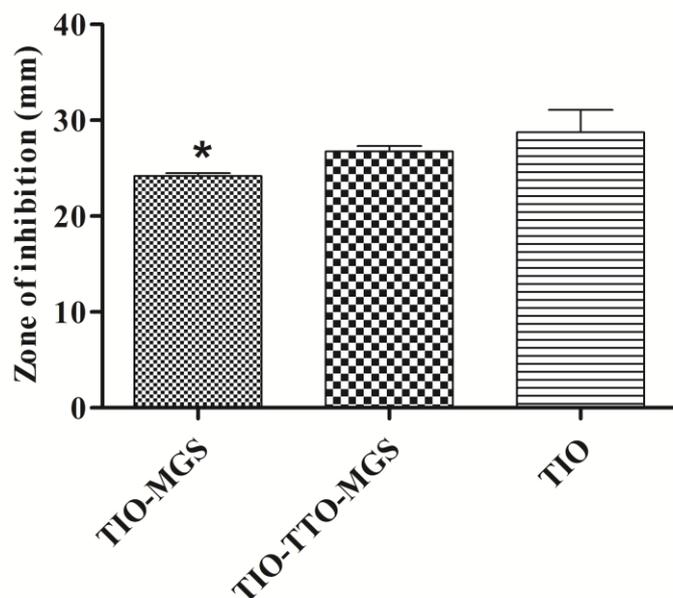
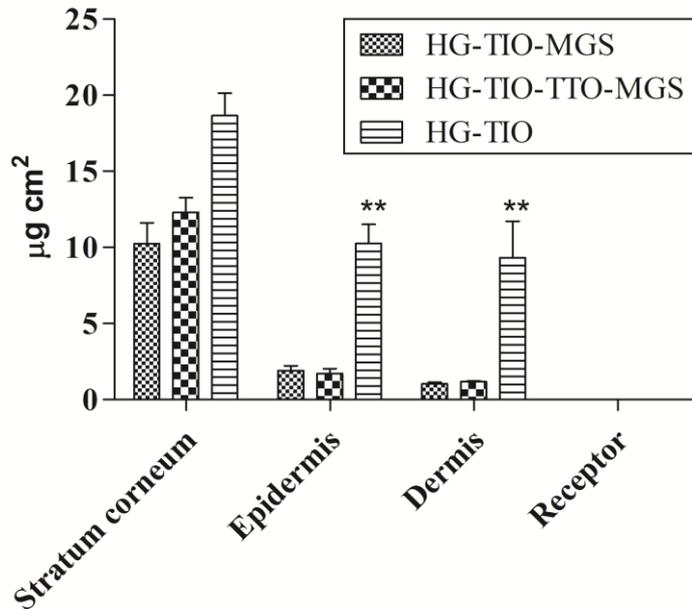


Fig 4. *In vitro* activity of free tioconazole and loaded-MGS and TTO-MGS against *C. albicans* (n = 6). \*Statistically different (one-way ANOVA, followed by Tukey's Test;  $p \leq 0.05$ )

Fernanda Cramer Flores

**LIPID NANOPARTICLES OBTAINED WITH INNOVATIVE NATURAL MATERIALS FOR TOPICAL DELIVERY OF TIOCONAZOLE: MANGOSPHERES**

**Figure 5.**



**Fig 5. Skin penetration profiles of hydrogels containing free tioconazole (HG-TIO), and tioconazole loaded-Mangospheres (HG-TIO-MGS and HG-TIO-TTO-MGS) (n = 6). \*\*Statistically different ( $p \leq 0.05$ )**



**CAPÍTULO 2: Desenvolvimento de nanocápsulas poliméricas de óleo de copaíba com revestimento catiônico para liberação cutânea de tioconazol**

Artigo a ser submetido

---



## **CAPÍTULO 2: Desenvolvimento de nanocápsulas poliméricas de óleo de copaíba com revestimento catiônico para liberação cutânea de tioconazol**

### 2.1 INTRODUÇÃO

O capítulo anterior (Capítulo 1) contemplou o desenvolvimento de formulações nanoestruturadas lipídicas, as quais apresentaram características físico-químicas satisfatórias, controle de liberação do tioconazol e a manutenção da atividade antifúngica do fármaco após veiculação nas Mangosesferas. A partir disso, foram desenvolvidos hidrogéis contendo as nanoestruturas lipídicas, os quais demonstraram-se promissores para o tratamento tópico de micoses superficiais, uma vez que o tioconazol, quando veiculado às Mangoesferas proporcionou o direcionamento deste ao sítio de infecção fúngica.

Dando continuidade aos estudos, sistemas poliméricos tornam-se o foco do presente capítulo. Nanocápsulas poliméricas contendo como núcleo oleoso o óleo de copaíba e o antifúngico tioconazol foram desenvolvidas. Com o intuito de conferir bioadesividade a estes sistemas, e com isso, aumentar o tempo de residência do fármaco no local de ação (estrato córneo), foi estudado o desenvolvimento do revestimento das nanocápsulas com o polímero catiônico quitosana. As formulações foram preparadas e avaliadas quanto as suas propriedades físico-químicas e quanto ao perfil de liberação *in vitro* do tioconazol. As formulações que apresentaram superioridade em relação às características físico-químicas foram eleitas para a continuidade dos experimentos, que compreenderam avaliação *in vitro* do potencial irritante, da capacidade bioadesiva *in vitro* e atividade antifúngica *in vitro*.

As suspensões poliméricas selecionadas foram utilizadas para a preparação e caracterização de hidrogéis de hidroxietilcelulose. Ainda, os hidrogéis foram caracterizados e avaliados quanto à capacidade de bioadesão *in vitro* e quanto à penetração cutânea do tioconazol em pele suína.

DESENVOLVIMENTO DE NANOCÁPSULAS POLIMÉRICAS DE ÓLEO DE COPAÍBA  
COM REVESTIMENTO CATIÔNICO PARA LIBERAÇÃO CUTÂNEA DE  
TIOCONAZOL

F. C Flores<sup>1</sup>; R. S. Rosso<sup>2</sup>; M. H. Motta<sup>1</sup>; R. C. R. Beck<sup>3</sup>; C. B. Silva<sup>1</sup>.

<sup>1</sup>Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, BR.

<sup>2</sup>Curso de Farmácia, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, BR.

<sup>3</sup>Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, BR

## Abstract

This work aimed to develop tioconazole-loaded copaiba oil polymeric nanocapsules (TIO-NC<sub>COPA</sub>), its coating using a cationic polymer (TIO-C-NC<sub>COPA</sub>) and a further development of hydrogels containing the nanocapsules. The nanocapsule suspensions showed a slightly acid pH, nanometric size around 175 nm with low polydispersity index (<0,15) and control of drug release, which was greater for TIO-NC<sub>COPA</sub>. Zeta potential was negative for TIO-NC<sub>COPA</sub> and positive for TIO-C-NC<sub>COPA</sub> and for both formulations tioconazole content was close to theoretical values (1 mg/mL). Both nanocapsules suspensions presented antifungal activity against *C. albicans* and showed to reduce the irritant potential of tioconazole while TIO-C-NC<sub>COPA</sub> presented bioadhesive properties. The semisolid formulations containing the nanostructures exhibited Hershel-Bulckley behavior, drug content close to 100% and slightly acid pH. HG-TIO-C-NC<sub>COPA</sub> showed bioadhesive properties, was able to targeting tioconazole to stratum corneum, the specific site of dermatophyte fungi installation, and was stable for 60 days. The new developed HG-TIO-C-NC<sub>COPA</sub> is a valuable promise for the topical treatment of superficial mycoses.

**KEY WORDS:** polymeric nanocapsules; cationic coating; copaiba oil; tioconazole; dermatophytosis.

## 1 INTRODUÇÃO

Micoses superficiais são infecções fúngicas causadas principalmente por fungos dermatófitos pertencentes aos gêneros *Epidermophyton*, *Microsporum* e *Trichophyton* (MARTINEZ-ROSSI; PERES; ROSSI, 2008; MINGNON et al., 2008) e leveduras como *Candida* spp. Estes agentes etiológicos instalam-se em tecidos queratinizados como pele, pelos, cabelos e unhas, extraindo, a partir da queratina, enxofre, carbono e nitrogênio, nutrientes necessários ao desenvolvimento fúngico (GUPTA; CHAUDHRY; ELEWSKI, 2003; SIDRIM; ROCHA, 2004; KANBE, 2008). Dentre os agentes acima citados causadores de micoses superficiais, ganham destaque os dermatófitos, devido à frequência com que são isolados das lesões (LACAZ et al., 2002). Espécies de *Candida* por vezes incitam infecções oportunistas, que podem variar de lesões superficiais menos severas para condições sistêmicas preocupantes, dependendo da debilidade do sistema imune do hospedeiro (JAYATILAKE; TILAKARATNE; PANAGODA, 2009). A elevada virulência destes agentes é atribuída à secreção de proteínas queratolíticas, somada à ação das glicoproteínas, por eles, também secretadas, que conferem aderência ao substrato (MARTINEZ-ROSSI; PERES; ROSSI, 2008).

O tioconazol é um antifúngico imidazólico de amplo espectro indicado para o tratamento de dermatofitoses (SWEETMAN, 2006) e candidíase vaginal (NYIRJESY, 2008). Todavia, sua atividade fungicida implica na utilização de altas concentrações, o que está relacionado ao surgimento de alergias de contato (STUBB et al., 1992; GUIN; KINKANNON, 1997).

O óleo de copaíba (*Copaífera* L.) é um óleo resina utilizado como cicatrizante, anti-inflamatório e antisséptico (VEIGA JR.; PINTO, 2002; PIERI et al., 2009), sendo ativo frente a espécies de *Candida* e alguns dermatófitos como *T. rubrum* e *M. canis* (SVETLICHNY et al. 2015). É composto majoritariamente por sesquiterpenos e diterpenos, o que confere a ele propriedades resinosas e voláteis (VEIGA JR.; PINTO, 2002). Este óleo é capaz de reduzir a irritação, a dor, o edema e o calor local quando utilizado no tratamento tópico de dermatites, inclusive podendo substituir a terapia por corticoides (HADJI-MINAGLOU; BOLCATO, 2005).

Os sistemas nanoestruturados vêm assumindo papel fundamental na indústria farmacêutica (KAUR et al., 2010) devido às vantagens conferidas, como aperfeiçoar a liberação de substâncias de uma forma precisa, segura e reproduzível, propiciando efeito terapêutico máximo com o mínimo de efeitos adversos (MISHRA; PATEL; TIWARI, 2010).

Além disso, surge como ferramenta na redescoberta de fármacos mais antigos, podendo aumentar a vida útil destes, a partir da reformulação com novo sistema de entrega.

Assim, aliando os efeitos benéficos proporcionados pela nanotecnologia às propriedades medicinais do óleo de copaíba, o objetivo do presente trabalho foi desenvolver nanocápsulas poliméricas contendo tioconazol e como núcleo oleoso o óleo de copaíba. Além disso, sabendo-se que a pele apresenta carga superficial negativa, assim como as mucosas, pensou-se no revestimento catiônico das nanocápsulas, com o intuito de conferir bioadesividade às nanopartículas. Ainda, foram desenvolvidos hidrogéis contendo os nanocarreadores propostos no estudo para o tratamento tópico de dermatofitoses.

## **2 PARTE EXPERIMENTAL**

### **2.1 MATERIAL**

Tioconazol foi adquirido na Pharma Nostra (São Paulo, Brasil). O polímero poli( $\epsilon$ -caprolactona) (PCL,  $M_w = 70,000-90,000$ ), a quitosana de baixo peso molecular e o monoestearato de sorbitano foram adquiridos na Sigma-Aldrich (São Paulo, Brasil). Lipoid<sup>®</sup> S75 (Lecitina de soja) foi adquirido da Lipid Ingredients & Technologies (São Paulo, Brasil). Polissorbato 80 da Delaware (Porto Alegre, Brasil); imidazolinidil ureia da Fragon (São Paulo, Brasil) e hidroxietilcelulose da Deg (São Paulo, Brasil). As cepas de *C. albicans* (ATCC 10231) foram gentilmente doadas pelo Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde (INCQS – FIOCRUZ, Rio de Janeiro, Brazil). Todos os outros reagentes possuíam grau analítico ou farmacêutico.

### **2.2 TESTE DO INCHAMENTO/DISSOLUÇÃO DO POLÍMERO**

Filmes de PCL foram obtidos em prensa hidráulica a partir da aplicação de 5 ton por 5 min (P30000, Bovenau, Brasil). Cada filme foi precisamente pesado e totalmente imerso em volume suficiente de óleo de copaíba, em frascos de vidro fechados. Em tempos pré-determinados (0, 3, 6, 9, 12, 15, 18, 21, 24, 27, 30 dias), os filmes poliméricos foram retirados dos frascos com auxílio de uma pinça e o óleo foi cuidadosa e totalmente removido com papel absorvente. Os filmes poliméricos foram então pesados em balança analítica.

## 2.3 PREPARAÇÃO DAS NANOCÁPSULAS POLIMÉRIAS E FORMULAÇÕES SEMISSÓLIDAS

As suspensões de nanocápsulas poliméricas contendo óleo de copaíba e tioconazol a uma concentração de 1 mg/mL foram preparadas (n=3) por deposição interfacial do polímero pré-formado (FESSI et al., 1989). Resumidamente, o óleo de copaíba (0,33 mL), o tioconazol (0,01 g), a lecitina (0,03 g) e o polímero – PCL (0,1 g) foram solubilizados em acetona (25 mL), a 40 °C, por uma hora, e então esta fase orgânica foi adicionada sob fluxo constante à 50 mL da fase aquosa de polissorbato 80 (0,0768 g) e mantida sob agitação por 10 min. A formulação foi levada a evaporador rotatório para eliminação do solvente e ajuste da concentração final de tioconazol a 1 mg/mL e denominada TIO-NC<sub>COPA</sub>. As formulações revestidas com quitosana (polímero catiônico) foram preparadas a partir da incubação de 9 mL das TIO-NC<sub>COPA</sub> com 1 mL de solução de quitosana (SIQUEIRA et al., 2011), preparada a partir da solubilização de 1% de quitosana em solução de ácido acético a 0,5%, por uma hora. As formulações revestidas foram denominadas TIO-R-NC<sub>COPA</sub>. Adicionalmente, foram preparadas e avaliadas formulações controle (sem o fármaco) e denominadas NC<sub>COPA</sub> e R-NC<sub>COPA</sub>.

As formulações semissólidas contendo 1 mg/g de tioconazol foram preparadas a partir da dissolução de hidroxietilcelulose (1,5%) e imidazolinidil ureia (0,6%) nas suspensões coloidais e denominadas HG-TIO-NC<sub>COPA</sub> e HG-TIO-R-NC<sub>COPA</sub>. Foram também preparados hidrogéis contendo as nanoestruturas sem o fármaco (HG-NC<sub>COPA</sub> e HG-R-NC<sub>COPA</sub>) e um hidrogel contendo o fármaco não associado (HG-TIO, 1 mg/ g), substituindo as suspensões coloidais por uma solução hidroalcoólica (80/20, v/v) do tioconazol. Todas as formulações foram preparadas em triplicata.

## 2.4 CARACTERIZAÇÃO DOS SISTEMAS COLOIDAIIS

Após preparação, as suspensões coloidais foram caracterizadas e armazenadas ao abrigo da luz e à temperatura ambiente. Durante 60 dias, os parâmetros físico-químicos (teor de fármaco, diâmetro médio de partícula, índice de polidispersão, potencial zeta e pH) foram monitorados.

### 2.4.1 Determinação do pH

Os valores de pH foram verificados diretamente nas suspensões coloidais com auxílio de um potenciômetro previamente calibrado (Seven Easy, Mettler Toledo, Brasil). Para as formulações semissólidas, as mesmas foram previamente dispersas em água deionizada (10% m/v), de acordo com a Farmacopéia Brasileira V (2010). As análises foram realizadas em triplicata.

### 2.4.2 Avaliação do diâmetro médio de partícula e potencial zeta

O diâmetro médio de partícula e o índice de polidispersão (PDI) foram determinados por espectroscopia de correlação de fótons (PCS; ZetasizerNano ZS, Malvern Instruments, UK), em triplicata. Para o ensaio, as formulações (TIO-NC<sub>COPA</sub> e TIO-R-NC<sub>COPA</sub>) foram diluídas (500x) em água purificada.

A análise do potencial zeta das nanossuspensões foi realizada a partir da medida da mobilidade eletroforética das partículas (n=3) (ZetasizerNano ZS, Malvern Instruments, UK). Para esta determinação, as amostras foram previamente diluídas (500x) em uma solução de cloreto de sódio 10mM.

### 2.4.3 Teor de tioconazol e eficiência de encapsulamento

A quantidade total de fármaco presente nas suspensões de nanocápsulas foi determinada por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) (Agilent, 1260, USA), conforme metodologia analítica previamente validada (HÄRTER et al., 2014). Para as análises, 100 µL de cada suspensão de nanocápsulas (TIO-NC<sub>COPA</sub> e TIO-R-NC<sub>COPA</sub>) foram diluídos em metanol (10 mL) e o fármaco extraído por ultrassonicação, por 30 minutos. Após, 20 µL de cada amostra previamente filtrada (0,45 µm) foram injetados no cromatógrafo e carregados por uma fase móvel constituída de uma solução de metanol: água (pH 11) (80:20, v/v), sob fluxo de 1,0 mL/min. A coluna cromatográfica utilizada foi uma Gemini C18 (150 x 4,6 mm, 45 µm, Phenomenex, USA) e o comprimento de onda de 219 nm. Para análise do teor de tioconazol nos hidrogéis, 0,1 g de cada semissólido foi pesado e o fármaco extraído em 10 mL de metanol, seguido de ultrassonicação, por 30 min. As amostras foram filtradas (0,45 µm) e analisadas (20 µL) conforme descrito anteriormente. A determinação da eficiência de encapsulamento partiu da ultrafiltração-centrifugação (Ultrafree-MC 10 000

MW, Merck Millipore, Germany) de 300  $\mu$ L de cada suspensão de nanocápsulas a 2000xG rpm, por 7 minutos, a 25 °C. O ultrafiltrado foi analisado por CLAE sob as mesmas condições descritas acima.

#### 2.4.4 Avaliação da viscosidade das suspensões coloidais

A avaliação da viscosidade das suspensões coloidais foi conduzida a 25 °C em viscosímetro rotacional (Brookfield LVDVII+ PRO Digital Viscosimeter, Brookfield Instruments, UK). As amostras foram depositadas (12 mL) em um aparato para viscosidade ultra-baixa e analisadas com auxílio de *spindle* ULA. Para cada amostra, 10 pontos foram avaliados, iniciando com uma velocidade de 60 RPM, sofrendo acréscimos de 2,5 RPM a cada minuto.

#### 2.4.5 Determinação da distribuição de fármaco nos sistemas coloidais

A fim de determinar a localização do tioconazol na partícula, o algoritmo proposto por Oliveira e colaboradores (2013) foi seguido experimentalmente. Primeiramente cada amostra (TIO-NC<sub>COPA</sub> e TIO-R-NC<sub>COPA</sub>) sofreu diluições subsequentes em água (1:1, 1:10, 1:100 and 1:1000, v/v) e então 300  $\mu$ L de cada foi submetida a ultrafiltração-centrifugação (Ultrafree-MC 10 000 MW, Merck Millipore, Germany) a 2000xG, por 5 min, e a quantidade de tioconazol no ultrafiltrado foi verificada por CLAE (HÄRTER et al., 2014). A cada diluição, os resultados foram analisados de acordo com o algoritmo.

### 2.5 ESTUDO DE LIBERAÇÃO DO TIOCONAZOL A PARTIR DAS NANOCÁPSULAS

A avaliação da liberação do tioconazol a partir das nanocápsulas foi conduzida, em triplicata, utilizando sacos de diálise (MWCO = 12 a 14 KDa, Sigma-Aldrich Corporation, USA). O meio de liberação, água:etanol (70:30, v/v) foi escolhido de forma a atender as condições de não saturação (condições Sink). Assim, 1,5 mL de cada formulação (TIO-NC<sub>COPA</sub>, TIO-R-NC<sub>COPA</sub> e TIO-S) foi introduzida no interior do saco de diálise e este imerso no meio de liberação, a uma temperatura de 35 °C, sob agitação constante, por 30 h. Amostras de meio foram coletadas em períodos de tempo pré-determinados (0, 1, 2, 4, 6, 8, 12, 24 e 30 h) e analisadas por CLAE (Agilent, 1260, USA) (HÄRTER et al., 2014). A cada coleta, a mesma quantidade de meio coletado foi imediatamente repostada por meio fresco. Os resultados

obtidos foram analisados com auxílio de *software* (MicroMath<sup>®</sup> Scientist<sup>®</sup> for Windows<sup>TM</sup>), segundo os modelos matemáticos de ordem zero ( $C = k_0 t$ ), primeira ordem (mono-exponencial,  $C = C_0 e^{-kt}$  e bi-exponencial,  $C = a e^{-k_1 t} + b e^{-k_2 t}$ ) e Korsmayer-Peppas ( $C_t = a t^n$ ). Nos quais  $C$  se refere à quantidade de fármaco liberada no tempo  $t$ ;  $k$  à velocidade de dissolução;  $a$  e  $b$  as concentrações de fármaco, e  $n$  o expoente de liberação, segundo Costa e Lobo (2001). O modelo mais adequado a representar a liberação do tioconazol foi eleito a partir do coeficiente de correlação ( $r$ ), o critério de seleção do modelo (MSC) e o ajuste gráfico.

## 2.6 VERIFICAÇÃO DO POTENCIAL BIOADESIVO DAS NANOCÁPSULAS

Este ensaio foi conduzido a fim de verificar se após o revestimento catiônico, as nanocápsulas apresentariam características de superfície adequadas para bioadesão. O ensaio é baseado no método que avalia a interação mucina-partícula, proposto por Takeuchi e colaboradores (2005). Assim, as suspensões (TIO-NC<sub>COPA</sub> e TIO-R-NC<sub>COPA</sub>) foram diluídas em uma suspensão de mucina suína Tipo II (0,1% w/v) (Sigma-Aldrich), na proporção 1:500 (n=3) e, após, o diâmetro das partículas e o potencial zeta foram avaliados e comparados com os valores obtidos pela mesma diluição das formulações em água ultrapura (ZetasizerNano ZS, Malvern Instruments, UK). Alterações no diâmetro médio e no potencial zeta foram considerados indicativos de interação com a mucina.

## 2.7 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIFÚNGICA *IN VITRO* DAS SUSPENSÕES DE NANOCÁPSULAS

Para este experimento, um repique de *C. albicans* (ATCC 10231) foi cultivado em tubo inclinado contendo ágar Sabouraud dextrose (ASD, Merk), por 48 h, a 25 °C. As células fúngicas foram ressuspensas em solução salina (solução de NaCl a 0,9%) e então diluídas de modo a se obter uma concentração de cerca de  $10^7$  unidades formadoras de colônias a cada mililitro (UFC/mL). Procedeu-se a inoculação do caldo Sabouraud dextrose (Merk) a partir da suspensão da levedura, obtendo-se cerca de  $10^3$  UFC/mL de caldo. As suspensões coloidais (TIO-NC<sub>COPA</sub> e TIO-R-NC<sub>COPA</sub>) e uma solução de fármaco livre foram adicionadas ao caldo inoculado de modo a se atingir uma concentração de fármaco de 5 µg/mL, o que corresponde à concentração inibitória mínima de tioconazol para esta levedura (JERVONS, 1979). As amostras foram incubadas a 37 °C, sob agitação moderada e constante, e após os

períodos de 0, 4, 8, 12, 24 e 48 h, alíquotas foram coletadas (200 µL), diluídas em solução salina e distribuídas em placas de Petri com posterior adição de meio de cultura. As placas foram incubadas a 25 °C, por 48 h, e após, a viabilidade celular nos diferentes tempos foi verificada. Foram utilizadas placas contendo de 10-100 colônias para a contagem. Os resultados foram expressos em log UFC/mL e comparados com os resultados obtidos para a solução do fármaco. Como controle, foram também avaliadas as formulações sem o fármaco.

## 2.7 AVALIAÇÃO DO POTENCIAL IRRITANTE *IN VITRO* DAS SUSPENSÕES COLOIDAIS

A avaliação do potencial de irritação das suspensões coloidais (TIO-NC<sub>COPA</sub> e TIO-R-NC<sub>COPA</sub>) foi verificada pelo método de HET-CAM (Hen's Egg Test – Chorioallantoic Membrane) proposto por Lupke (1985), que constitui um experimento alternativo ao teste de irritação conduzido em coelhos. O método exibe alta sensibilidade e possibilita a classificação do potencial irritante das formulações, com o discernimento entre substâncias irritantes e não irritantes (SPIELMAN, 1997). Foram utilizados ovos de galinha Cobb 500 (Laboratório de Avicultura, LAVIC, UFSM), fecundados e incubados (a uma temperatura de 37,7 °C e 32,2 % de umidade relativa) por 9 dias. Para cada ovo, a casca no lado da câmara de ar foi retirada com auxílio de pinça e a membrana externa, após ser umedecida com solução fisiológica estéril, foi cuidadosamente removida expondo a membrana cório-alantóide. As suspensões coloidais contendo o fármaco, uma solução hidroetanólica (20%) de tioconazol (1 mg/mL), as nanocápsulas sem o fármaco R-NC<sub>COPA</sub>, NC<sub>COPA</sub> e solução hidroetanólica a 20% foram aplicadas (200 µL) diretamente na membrana cório-alantóide e deixadas em contato por 20 s e, após, foram totalmente removidas com solução fisiológica. A observação visual dos eventos de vasodilatação, hemorragia e coagulação procedeu-se durante 5 min e o tempo de surgimento de cada evento foi registrado. Como controle positivo para os eventos foi utilizada solução de lauril sulfato de sódio 1% e como controle negativo, solução fisiológica estéril. As análises foram realizadas em sextuplicata. Para a determinação do grau de irritação o índice de HET-CAM (HET-CAM) foi calculado a partir do tempo necessário para que os eventos ocorressem, conforme a Equação 1:

$$\text{HET-CAM} = (301 - h) \times 5 / 300 + (301 - v) \times 7 / 300 + (301 - c) \times 9 / 300 \quad (1)$$

Onde  $h$  é o tempo (segundos) no qual se observou a presença de hemorragia;  $v$  é o tempo (segundos) no qual se observou a presença de vasodilatação e  $c$  é o tempo (segundos) no qual se observou a presença de coagulação.

A partir dos valores de HET-CAM obtidos, as formulações foram classificadas de acordo com a Tabela 1:

Tabela 1 – Classificação do potencial de irritação de acordo com o índice de HET-CAM

<b>Índice de HET-CAM</b>	<b>Grau de Irritação</b>
0,0 – 0,9	Não irritante
1,0 – 4,9	Ligeiramente irritante
5,0 – 8,9	Irritante
9,0 – 21	Muito irritante

## 2.9 CARACTERIZAÇÃO DOS HIDROGÉIS

Os hidrogéis foram caracterizados macroscopicamente e de acordo com os testes descritos a seguir. Em relação ao pH e teor de tioconazol, os mesmos encontram-se apresentados nos itens 2.4.1 e 2.4.3, respectivamente.

### 2.9.1 Tamanho de partícula

A presença das nanopartículas posteriormente à incorporação das suspensões de nanocápsulas nas formulações semissólidas foi avaliada, em triplicata, após redispersão dos hidrogéis em água ultra-pura (500x). As amostras foram filtradas (Quanta JP41, 80 g/m<sup>2</sup>; 28 µm, J Prolab, Brasil) e analisadas por espectroscopia de correlação de fótons (ZetasizerNano ZS, Malvern Instruments, UK).

### 2.9.2 Avaliação das propriedades reológicas e da espalhabilidade

As formulações semissólidas foram submetidas à análise reológica em viscosímetro rotacional (Brookfield LVDVII+ PRO Digital Viscosimeter, Brookfield Instruments, UK). Os hidrogéis foram acondicionados em adaptador para pequenas amostras e as análises foram realizadas em triplicata, utilizando *spindle* SC4-25, aplicando uma rampa de tensão de cisalhamento por 1760 s, a um intervalo de 0,22 s<sup>-1</sup>. A fim de estabelecer o modelo

matemático que melhor representa o comportamento de fluxo dos hidrogéis, os resultados foram analisados (Rheoclast software V3.1-1 version, Brookfield Instruments, UK) de acordo com os seguintes modelos: Bingham ( $\tau = \tau_0 + \eta\dot{\gamma}$ ), Casson ( $\tau = \tau_0^{0.5} + \eta^{0.5}\dot{\gamma}^{0.5}$ ), Ostwald ( $\tau = k\dot{\gamma}^n$ ) e Herschel-Bulkley ( $\tau = \tau_0 + \eta\dot{\gamma}^n$ ). Onde  $\tau$  representa a tensão de cisalhamento;  $\tau_0$  a tensão de cedência;  $\eta$  a viscosidade;  $k$  representa o índice de consistência;  $n$  o índice de fluxo e  $\dot{\gamma}$  a velocidade de cisalhamento (KIM et al., 2003).

A espalhabilidade dos hidrogéis foi também avaliada ( $n=3$ ). Este experimento procedeu-se de acordo com o método de digitalização de imagens proposto por Rigo e colaboradores (2012). As amostras foram aplicadas em um molde com orifício central na superfície do digitalizador (HP Deskjet, modelo F4280) e placas de pesos conhecidos foram, posteriormente, adicionadas a fim de representar a força aplicada. A imagem de cada área foi capturada e utilizada para calcular a área espalhada com o auxílio do programa ImageJ (Versão 1,44, National Institutes of Health, USA). Adicionalmente, a razão entre a área máxima espalhada  $A$  ( $\text{mm}^2$ ) e o peso aplicado  $P$  (g) foram calculados a fim de obter o fator de espalhabilidade (FE) (Equação 2) (MILAN et al., 2007).

$$FE = A/P \quad (2)$$

## 2.10 AVALIAÇÃO DO POTENCIAL BIOADESIVO DAS FORMULAÇÕES SEMISSÓLIDAS

As formulações semissólidas que continham as nanocápsulas revestidas com quitosana foram avaliadas quanto ao potencial bioadesivo pelo método de escoamento de líquido, proposto por Nielsen e colaboradores (1998), modificado por Carvalho e colaboradores (2014), e adaptado por Lima (2015). Os hidrogéis foram aplicados (1 g) e cuidadosamente espalhados em uma superfície de mucina (ágar-mucina), simulando uma superfície negativamente carregada, como é o caso do estrato córneo. O ágar-mucina, constituído de ágar (Ágar-Ágar, Himedia) (1,5%) e mucina (1%) (Mucina suína Tipo II, Sigma-Aldrich) foi posicionado no centro de um tubo cilíndrico longitudinalmente cortado (30 cm) e disposto sob uma inclinação de 45 °C de modo a permitir o escoamento do fluido. O fluido (tampão fosfato pH 7,4 e 0,5% de polissorbato 80) foi aplicado (0,21 L/h, 37 °C), por 10 min, na extremidade superior do cilindro, com auxílio de uma bomba peristáltica, a fim de permitir total contato com a formulação a ser avaliada. Abaixo da outra extremidade do cilindro, o fluido carreador do semissólido não aderido ao gel de mucina foi coletado. Após, adicionou-se metanol e sob

agitação constante por uma hora, procedeu-se a extração do fármaco. As amostras foram filtradas (0,45  $\mu\text{m}$ ) e então analisadas por CLAE, de acordo com metodologia descrita anteriormente.

## 2.11 ESTUDO DE PERMEAÇÃO/PENETRAÇÃO *IN VITRO* DO TIOCONAZOL A PARTIR DOS HIDROGÉIS

O estudo de permeação/penetração foi conduzido para investigar o efeito do revestimento catiônico sobre a distribuição do tioconazol nas camadas da pele utilizando células de difusão do tipo Franz manuais e pele suína como membrana. A pele foi gentilmente doada por um abatedouro local (Santo Ângelo, Brasil). Para o experimento, o tecido adiposo foi removido e a pele limpa com solução aquosa de lauril sulfato de sódio (2 %) e água deionizada e mantida congelada a  $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$  até o momento do experimento. Foram utilizadas peças de pele de até 2 mm de espessura (medidas com paquímetro digital Mitutoyo), as quais foram dispostas entre o compartimento doador e o receptor, compreendendo uma área de permeação de  $2,13\text{ cm}^2$ . Doses infinitas de tioconazol, correspondentes a 500 mg de cada hidrogel (HG-TIO-NC<sub>COPA</sub>, HG-TIO-R-NC<sub>COPA</sub> e HG-TIO, n=8) foram aplicadas na pele suína e esta acomodada entre o compartimento doador e o receptor. Cerca de 7 mL de meio de liberação (água:etanol, 60:40, v/v) preencheu o compartimento receptor e este foi mantido sob agitação moderada e constante a  $32\text{ }^{\circ}\text{C}$ , por 8 h. Ao final do período estipulado, o meio receptor foi coletado e o aparato desmontado. O excesso de formulação foi cuidadosamente removido com algodão e as camadas da pele foram separadas. O estrato córneo foi removido pela técnica de *tape stripping*, onde foram conduzidas sucessivas aplicações da fita (Scotch tape 3M®, St. Paul, MN). A epiderme viável foi separada da derme realizando-se raspagens com auxílio de bisturi e espátula, após imersão da peça em água deionizada, a  $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ , por 60 s. A derme foi fragmentada em pequenas porções com auxílio de bisturi. Por se tratar de uma análise bioanalítica, a metodologia foi validada de acordo com o Guia para Indústria de Validação de Métodos Bioanalíticos (FDA, 2001). A extração do tioconazol a partir das diferentes camadas da pele suína foi previamente padronizada, garantindo recuperação de, aproximadamente, 100% de fármaco utilizando acetonitrila em quantidades suficientes, com aplicação de 2 min de vórtex, seguido de 30 min de ultrassom. As amostras de meio receptor coletadas ao final de 8 h e as amostras advindas da extração foram filtradas (0,45  $\mu\text{m}$ ) previamente à injeção (40  $\mu\text{L}$ ) no cromatógrafo líquido (Agilent, 1260, USA) e analisadas sob a mesma metodologia descrita anteriormente.

## 2.12 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Todas as formulações foram preparadas e analisadas em triplicata. Os resultados foram expressos como média  $\pm$  desvio padrão e analisados por análise de variância de uma via, seguido do teste de Tukey, a um nível de significância de 5%. Os resultados referentes aos estudos de atividade antifúngica e permeação/penetração foram expressos em média  $\pm$  erro padrão.

## 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 3.1 TESTE DE INCHAMENTO DO POLÍMERO

O primeiro passo no desenvolvimento de uma suspensão de nanocápsulas é ter a certeza de que a estrutura vesicular não será perdida com o passar do tempo. A fim de garantir que o óleo de copaíba não atuaria como um solvente para o polímero, o que acarretaria na desestruturação do invólucro polimérico, o teste de inchamento/dissolução do polímero foi conduzido (WEISS-ANGELI et al., 2008). O teste de inchamento do polímero consiste em uma avaliação simples para verificar se o óleo eleito, no caso o óleo de copaíba, ao entrar em contato com a parede polimérica, agiria como um solvente do polímero (POHLMANN et al., 2013). Esta informação está diretamente relacionada com a estabilidade do invólucro polimérico após a obtenção das nanocápsulas. Analisando os filmes poliméricos imersos no óleo de copaíba (Figura 1), percebe-se que não houve alteração no peso dos filmes ao longo de 30 dias, indicando que não houve dissolução, solubilização ou retenção do óleo nas cadeias poliméricas. Assim, a combinação entre o óleo de copaíba e o polímero PCL é favorável para a formação de uma parede polimérica estável na produção de nanocápsulas poliméricas contendo o óleo de copaíba.

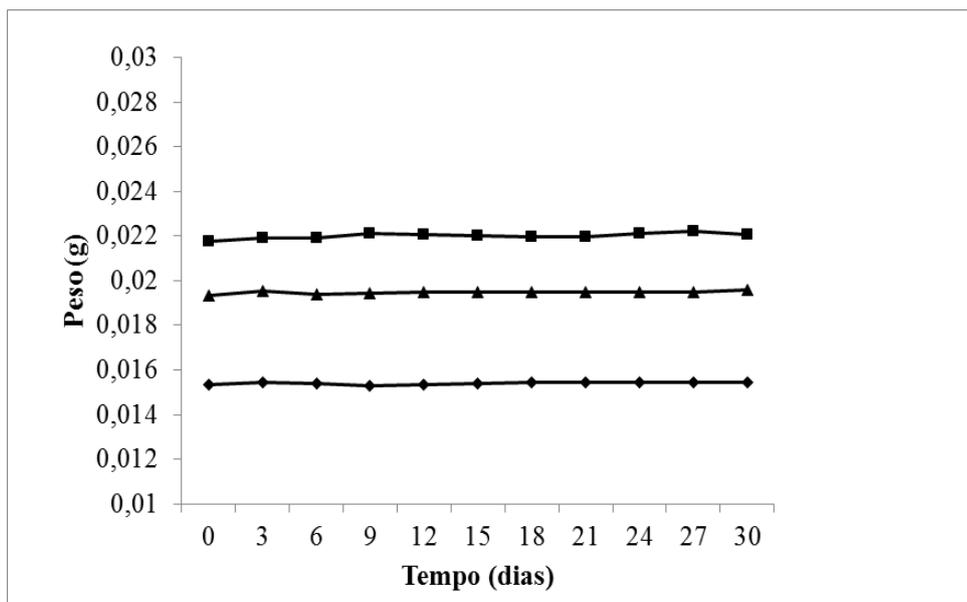


Figura 1. Peso dos filmes poliméricos de PCL na presença de óleo de copaíba durante 30 dias.

### 3.2 CARACTERIZAÇÃO DAS SUSPENSÕES COLOIDAIS

As suspensões coloidais exibiram aspecto homogêneo leitoso, com reflexo azulado, decorrente do efeito *Tyndall*. Todas as formulações apresentaram pH ligeiramente ácido, na faixa de 5,6 para TIO-NC<sub>COPA</sub> e 4,6 para TIO-R-NC<sub>COPA</sub> (Tabela 2). A diferença entre os valores de pH ( $p \leq 0,05$ ) deve-se ao revestimento pela quitosana, o qual foi realizado pela incubação da TIO-NC<sub>COPA</sub> com solução ácida de quitosana.

Tabela 2. Valores de pH, diâmetro médio de partícula, potencial zeta, índice de polidispersão (PDI) e teor de tioconazol das suspensões de nanocápsulas revestidas e não-revestidas (média  $\pm$  DP)

Formulação	pH	Diâmetro médio (nm)	Potencial zeta (mV)	PDI	Teor (mg/ mL)
TIO-NC <sub>COPA</sub>	5,57 $\pm$ 0,02 <sup>a</sup>	171 $\pm$ 5 <sup>a</sup>	- 12,6 $\pm$ 1,6 <sup>a</sup>	0,11 $\pm$ 0,01 <sup>a</sup>	0,99 $\pm$ 0,01 <sup>a</sup>
TIO-R-NC <sub>COPA</sub>	4,63 $\pm$ 0,03 <sup>b</sup>	176 $\pm$ 1 <sup>a</sup>	+26,5 $\pm$ 1,2 <sup>b</sup>	0,12 $\pm$ 0,02 <sup>a</sup>	1,01 $\pm$ 0,00 <sup>a</sup>

\*Letras diferentes em colunas iguais indicam diferença estatística ( $p \leq 0,05$ ).

As formulações apresentaram diâmetro de partícula na faixa nanométrica, em torno de 170 nm, com baixo índice de polidispersão, independente da presença do revestimento catiônico ( $p > 0,05$ ) (Tabela 2). Estes resultados apresentam-se menores do que os relatados em estudos prévios de obtenção de nanocápsulas contendo óleo de copaíba como núcleo

(VENTURINI et al 2015) e de nanocápsulas contendo tioconazol (RIBEIRO et al., 2016), os quais apresentaram tamanho de partícula em torno de 200 nm. Essa diferença pode estar relacionada à presença da lecitina de soja nas formulações. O potencial zeta apresentou-se negativo para TIO-NC<sub>COPA</sub> e positivo para TIO-R-NC<sub>COPA</sub>. Ambas as formulações apresentaram teor de fármaco próximo a 100% e, de acordo com os resultados referentes à eficiência de encapsulamento, aproximadamente 100% do fármaco encontra-se associado às nanopartículas tanto para TIO-NC<sub>COPA</sub> como para TIO-R-NC<sub>COPA</sub>. Estes parâmetros permaneceram os mesmos durante 30 dias, com exceção dos valores de pH para as TIO-NC<sub>COPA</sub>, que apresentaram um ligeiro decréscimo,  $4,76 \pm 0,27$ , ( $p \leq 0,05$ ), o que é considerado aceitável devido ao relaxamento das cadeias poliméricas de PCL expondo os grupamentos carboxílicos terminais (SCHAFFAZICK, et al., 2003).

As suspensões coloidais apresentaram comportamento Newtoniano de fluxo, com valores de viscosidade de  $1,26 \pm 0,01$  mPas para TIO-NC<sub>COPA</sub> e  $5,54 \pm 0,01$  mPas para TIO-R-NC<sub>COPA</sub>. Venturini e colaboradores (2015) desenvolveram nanocápsulas de óleo de copaíba e imiquimode e obtiveram valores semelhantes (1,30 mPas) de viscosidade para as suspensões. As formulações de nanocápsulas revestidas com quitosana apresentaram valores de viscosidade superiores ( $p > 0,05$ ) em relação às formulações não-revestidas, o que se deve, provavelmente, à presença da quitosana. Siqueira (2008) avaliou a viscosidade de suspensões de nanocápsulas revestidas e não revestidas com quitosana e observou maior viscosidade para aquelas revestidas com o polissacarídeo.

A determinação da distribuição do fármaco nas nanocápsulas auxilia em uma compreensão maior em relação ao comportamento destas nanopartículas. O algoritmo proposto por Oliveira e colaboradores (2013) permite elucidar a distribuição do fármaco em nanocápsulas poliméricas a partir da modificação do equilíbrio de distribuição deste conferida por sucessivas diluições em água. A classificação de distribuição leva em consideração o coeficiente de partição octanol:água do fármaco quando nanocápsulas de núcleo lipídico estão sendo avaliadas. No entanto, por se tratar de partículas diferentes, a determinação da distribuição do tioconazol foi realizada experimentalmente a partir das sucessivas diluições com subsequente ultrafiltração-centrifugação e análise do ultrafiltrado, de acordo com o proposto (OLIVEIRA et al., 2013). Os resultados obtidos para cada ultrafiltrado foram avaliados segundo o algoritmo. Dessa forma, o primeiro passo foi avaliar o percentual de fármaco quantificado no ultrafiltrado sem diluição prévia das amostras. Os resultados indicam que para TIO-NC<sub>COPA</sub> não houve quantificação no ultrafiltrado e para TIO-R-NC<sub>COPA</sub> uma quantidade inferior a 2% de tioconazol foi quantificada. Estas informações se repetiram nas

diluições 1:1 e 1:10. Na diluição 1:100 foi verificada a presença de 3% e 1% de tioconazol no ultrafiltrado para TIO-NC<sub>COPA</sub> e TIO-R-NC<sub>COPA</sub>, respectivamente, ao passo que após a diluição 1:1000 não houve quantificação de tioconazol para as duas formulações. A partir dos resultados, pode-se inferir que a classificação das nanocápsulas poliméricas revestidas e não revestidas enquadrou-se no modelo VI, em que o fármaco se encontra principalmente localizado no núcleo oleoso.

### 3.3 ESTUDO DE LIBERAÇÃO

De posse dos resultados, observou-se um controle na liberação do tioconazol para ambas as formulações (Figura 2). A liberação de fármacos a partir de nanopartículas poliméricas ocorre devido a inúmeros e complexos mecanismos, podendo envolver dessorção, difusão, erosão da partícula, ou ainda uma combinação destes e outros fatores (SIEPMANN; SIEPMANN, 2008). De acordo com o modelo da lei da potências, Korsmeyer-Peppas, o mecanismo pelo qual o tioconazol foi liberado é distinto entre as formulações. Para TIO-NC<sub>COPA</sub> a liberação do tioconazol ocorreu a partir de fenômenos de difusão do fármaco e relaxamento do polímero ( $n = 0,5911 \pm 0,1059$ ); entretanto, para TIO-R-NC<sub>COPA</sub>, a liberação do fármaco parece ter ocorrido por difusão fickiana ( $n = 0,3578 \pm 0,0185$ ).

Quanto ao perfil de liberação, as formulações desenvolvidas apresentaram cinética de liberação de primeira ordem seguindo um modelo Biexponencial (Tabela 3), o qual é caracterizado por apresentar duas fases de liberação, uma inicial, rápida, seguida da fase sustentada, mais lenta. A partir deste modelo é possível estimar as velocidades de liberação em cada uma das fases, sendo que a velocidade inicial de liberação do tioconazol foi  $0,0484 \pm 0,0025 \text{ h}^{-1}$  e  $0,1298 \pm 0,0215 \text{ h}^{-1}$  para TIO-NC<sub>COPA</sub> e TIO-R-NC<sub>COPA</sub>, respectivamente. Já na fase sustentada de liberação, o restante de fármaco foi liberado em uma velocidade de liberação de  $0,0139 \pm 0,0016 \text{ h}^{-1}$  (TIO-NC<sub>COPA</sub>) e  $0,0205 \pm 0,0010 \text{ h}^{-1}$  (TIO-R-NC<sub>COPA</sub>). Observa-se que as nanocápsulas revestidas com quitosana liberaram uma maior quantidade de fármaco ( $p \leq 0,05$ ) (70%) ao final de 30 h, enquanto que para as nanocápsulas não revestidas, o total de fármaco liberado ficou em torno de 50%, o que pode ser explicado pela natureza básica do tioconazol, ionizando-se em pH levemente ácido proporcionado pelo revestimento de quitosana. Como controle, uma solução hidroetanólica do fármaco foi também avaliada e apresentou uma velocidade de difusão de  $25,0476 \pm 0,3434 \text{ h}^{-1}$ , liberando em 4 h 100% do fármaco. Estes resultados corroboram com a classificação das nanocápsulas no modelo VI,

uma vez que as partículas proporcionaram uma liberação inicial mais rápida, seguida de uma liberação sustentada, confirmando a localização do fármaco em maior parte no núcleo.

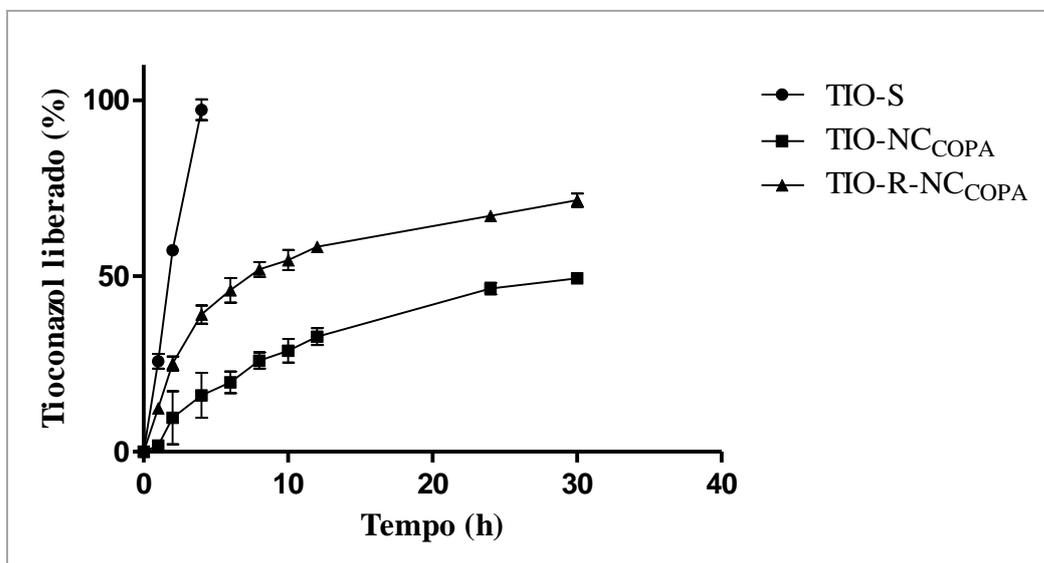


Figura 2. Perfil de liberação do tioconazol a partir das TIO-NC<sub>COPA</sub> e TIO-R-NC<sub>COPA</sub> e solução (TIO-S) por um período de 30 h (n=3, média  $\pm$  DP).

Tabela 3. Coeficiente de correlação ( $r$ ) e MSC referentes aos diferentes modelos matemáticos obtidos para a liberação do tioconazol a partir das suspensões de nanocápsulas (TIO-NC<sub>COPA</sub> e TIO-R-NC<sub>COPA</sub>) (n = 3, média  $\pm$  DP)

	TIO-NC <sub>COPA</sub>	TIO-C-NC <sub>COPA</sub>
<b>Ordem zero</b>		
r	0,9418 $\pm$ 0,0308	0,8414 $\pm$ 0,0136
MSC	1,4802 $\pm$ 0,7083	0,0761 $\pm$ 0,0078
<b>Monoexponencial</b>		
r	0,9651 $\pm$ 0,0310	0,9546 $\pm$ 0,0004
MSC	2,2664 $\pm$ 0,3312	1,2933 $\pm$ 0,0147
<b>Biexponencial</b>		
r	0,9987 $\pm$ 0,0001	0,9992 $\pm$ 0,0004
MSC	5,1773 $\pm$ 0,0313	5,6669 $\pm$ 0,5207

### 3.4 AVALIAÇÃO DO POTENCIAL BIOADESIVO DAS NANOCÁPSULAS REVESTIDAS COM QUITOSANA E ATIVIDADE ANTIFÚNGICA *IN VITRO*

O revestimento catiônico das nanocápsulas de óleo de copaíba e tioconazol foi realizado com o intuito de aliar as vantagens conferidas pelas nanopartículas com as

propriedades bioadesivas da quitosana, o que poderia aumentar a adesividade e o tempo de permanência das partículas e, conseqüentemente, do tioconazol na pele ou mucosas. Assim, o potencial bioadesivo conferido, neste caso pelo revestimento com quitosana, pode ser avaliado a partir da interação das nanopartículas com uma solução de mucina (FONSECA et al, 2014). Partindo-se do pressuposto que um polímero mucoadesivo ao entrar em contato com substâncias de carga contrária sofra, a partir das interações eletrostáticas, uma alteração em suas propriedades originais de superfície, essas alterações conduziriam a mudanças no potencial zeta e no tamanho de partícula (TAKEUCHI, 2005). As TIO-R-NC<sub>COPA</sub>, com diâmetro médio de  $183 \pm 8$  nm e potencial zeta de  $+11,4 \pm 0,7$  mV, ao serem incubadas com solução de mucina, passaram a apresentar diâmetro médio de  $242 \pm 13$  nm e potencial de superfície de  $-13,3 \pm 0,9$  mV. Já para as TIO-NC<sub>COPA</sub>, os valores iniciais foram de  $176 \pm 7$  nm para diâmetro médio e  $-11,9 \pm 0,9$  mV para potencial zeta, e os valores finais de  $177 \pm 9$  nm e  $-12,2 \pm 1,1$  mV. Observa-se que para as nanocápsulas revestidas, houve um aumento ( $p \leq 0,05$ ) no diâmetro de partícula e inversão de carga de potencial zeta após o contato com a mucina, indicando que houve interação entre as nanocápsulas e a mucina, o que é indicativo de bioadesividade. O mesmo não foi observado para as formulações não revestidas, uma vez que, após contato com a mucina, não ocorreram mudanças em relação ao diâmetro de partícula e potencial zeta ( $p > 0,05$ ).

A preservação da atividade antifúngica das suspensões de nanocápsulas contendo o óleo de copaíba, revestidas ou não, foi determinada a partir da avaliação da curva de inibição de crescimento de *C. albicans*, uma levedura de importância clínica. Os resultados referentes à atividade antifúngica ao longo de 48 h estão representados na Figura 3 e demonstram que o processo de preparação das suspensões de nanocápsulas e o posterior revestimento não interferiram na atividade antifúngica do tioconazol. Durante o período de estudo, tanto as nanocápsulas como a solução do fármaco impediram de forma equivalente ( $p > 0,05$ ) a multiplicação da levedura, mantendo a concentração celular em níveis próximos aos iniciais (aproximadamente  $10^4$  UFC/mL).

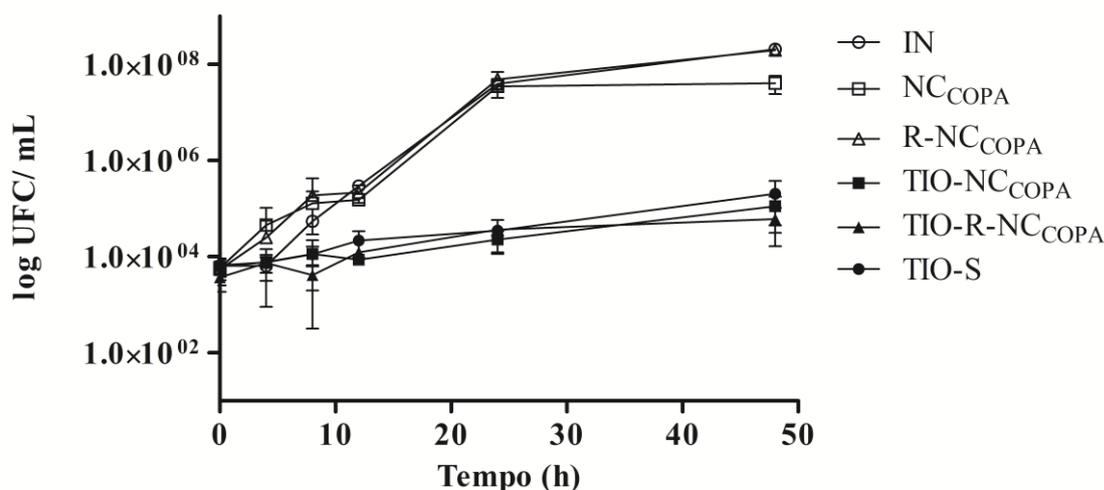


Figura 3. Valores de log UFC/mL para as suspensões de nanocápsulas (TIO-NC<sub>COPA</sub> e TIO-R-NC<sub>COPA</sub>), tioconazol em solução (TIO-S), nanocápsulas controle (sem o fármaco, NC<sub>COPA</sub> e R-NC<sub>COPA</sub>) e inóculo (IN), obtidos na avaliação da atividade antifúngica *in vitro* frente à *C. albicans* (n=3; média ± EP).

### 3.5 AVALIAÇÃO DO POTENCIAL IRRITANTE DAS NANOCÁPSULAS

A eficácia antifúngica do tioconazol está proporcionalmente condicionada com a concentração que ele atinge no seu local de ação (BEGGS, 1984). Entretanto, elevadas concentrações do fármaco podem ser responsáveis pelo surgimento de reações adversas, como dermatites de contato (STUBB et al., 1992; GUIN; KINKANNON, 1997) e ardência e queimação vaginal (SONNEX, 2004). Tão importante quanto determinar a eficácia de uma nova formulação, é a avaliação da sua segurança. Desta forma, as novas nanocápsulas foram avaliadas e classificadas conforme o grau de irritação que possam vir a causar, utilizando a metodologia *in vitro* HET-CAM. Os valores de HET-CAM calculados foram  $2,49 \pm 0,06$ ;  $1,56 \pm 0,03$  e  $9,89 \pm 0,11$  para TIO-R-NC<sub>COPA</sub>, TIO-NC<sub>COPA</sub> e TIO-S, respectivamente. A obtenção destes valores permitiu que ambas as suspensões de nanocápsulas fossem classificadas como ligeiramente irritantes (Tabela 1), ao passo que a solução de tioconazol, apresentou-se como muito irritante. Todas as amostras controle (NC<sub>COPA</sub> e R-NC<sub>COPA</sub>, e solução hidroetanólica 20%) foram classificadas como não-irritantes. Estes dados refletem a importância da veiculação do tioconazol às nanoestruturas, assegurando a eficácia antifúngica, com um menor grau de irritabilidade.

### 3.6 CARACTERIZAÇÃO DOS HIDROGÉIS CONTENDO AS NANOCÁPSULAS POLIMÉRICAS

As características físico-químicas dos hidrogéis foram avaliadas após a preparação, em 30 e 60 dias.

A incorporação das nanocápsulas poliméricas nos hidrogéis levou à obtenção de formulações semissólidas com características organolépticas satisfatórias, como aspecto brilhante e homogêneo e coloração branca.

A Tabela 3 expõe os resultados obtidos para os parâmetros avaliados na caracterização dos hidrogéis. As formulações semissólidas apresentaram pH levemente ácido, compatível com a aplicação cutânea (SCHREML et al., 2014). Diferenças entre os valores de pH foram observadas ( $p \leq 0,05$ ) devido, possivelmente, às diferenças encontradas para os valores de pH das suspensões originais. O teor de fármaco para ambos os hidrogéis foi próximo ao encontrado para as suspensões de nanocápsulas originais (cerca de 0,99 mg/g), demonstrando uma recuperação de, aproximadamente, 100% do fármaco.

Tabela 4. Caracterização físico-química dos hidrogéis: pH, índice de fluxo ( $n$ ), índice de consistência ( $k$ ), fator de espalhabilidade (FE) e teor de fármaco dos hidrogéis contendo as suspensões poliméricas HG-TIO-NC e HG-TIO-R-NC ( $n=3$ , média  $\pm$  DP).

Formulação	pH	$n^*$	$k$ (Pa S <sup>n</sup> )*	FE (mm <sup>2</sup> /g)	Teor (mg/g)
HG-TIO-NC <sub>COPA</sub>	6,20 $\pm$ 0,12 <sup>a</sup>	0,30 $\pm$ 0,03 <sup>a</sup>	45549 $\pm$ 8333 <sup>a</sup>	6,72 $\pm$ 0,24 <sup>a</sup>	0,99 $\pm$ 0,01 <sup>a</sup>
HG-TIO-R-NC <sub>COPA</sub>	5,20 $\pm$ 0,04 <sup>b</sup>	0,34 $\pm$ 0,06 <sup>a</sup>	47847 $\pm$ 5849 <sup>a</sup>	5,88 $\pm$ 0,26 <sup>b</sup>	0,99 $\pm$ 0,02 <sup>a</sup>
HG-TIO	6,53 $\pm$ 0,06 <sup>c</sup>	0,29 $\pm$ 0,05 <sup>a</sup>	60281 $\pm$ 13885 <sup>b</sup>	8,29 $\pm$ 0,55 <sup>c</sup>	1,01 $\pm$ 0,02 <sup>a</sup>

\*De acordo com o modelo de Hershel-Bulkley.

Letras diferentes em colunas diferentes representam diferença estatística ( $p \leq 0,05$ ).

O conhecimento das propriedades de fluxo e do comportamento reológico de formulações semissólidas é imprescindível para uma aplicação adequada e obtenção da eficiência desejada, uma vez que podem influenciar na liberação do fármaco a partir da forma farmacêutica (LEE; MOTURI; LEE, 2009). O estudo da reologia dos hidrogéis contendo as nanocápsulas desenvolvidas, HG-TIO-NC<sub>COPA</sub> e HG-TIO-R-NC<sub>COPA</sub>, e o fármaco não associado, HG-TIO, apontou um comportamento de fluxo não-Newtoniano e o modelo matemático que melhor os representa é o de Hershel-Bulkley. Este modelo descreve um

comportamento pseudo-plástico, com valores de índice de consistência e índice de fluxo, caracterizado pela diminuição da viscosidade com o aumento da taxa de cisalhamento (KIM et al., 2003). Os valores de índice de fluxo foram semelhantes para todos os hidrogéis, no entanto, os valores de índice de consistência foram semelhantes para os hidrogéis contendo as nanocápsulas ( $p > 0,05$ ) e menores em relação ao HG-TIO (Tabela 4). Embora as suspensões de nanocápsulas revestidas tenham apresentado valores de viscosidade superiores em relação às não revestidas, a presença destas não influenciou na viscosidade das formulações semissólidas, o que pode ser inferido ao avaliar os índices de consistência.

Estudos de espalhabilidade são úteis para avaliar a performance de formulações semissólidas após aplicação de uma força (GARG et al., 2002; BORGHETTI; KNORST, 2006). Este é um fator importante levando-se em consideração o local de aplicação que muitas vezes se apresenta injuriado e dolorido. Para uma melhor comparação entre os hidrogéis, o fator de espalhabilidade (FE) foi calculado (Tabela 4). Os HG-TIO apresentaram os maiores valores de FE ( $p \leq 0,05$ ). Além disso, pode-se perceber que os HG-TIO-NC<sub>COPA</sub> apresentaram valores de espalhabilidade maiores que os valores para HG-TIO-R-NC<sub>COPA</sub> ( $p \leq 0,05$ ), o que significa que se faz necessária uma maior força a ser aplicada para espalhar o HG-TIO-NC<sub>COPA</sub>, e maior ainda para o HG-TIO. Assim, o hidrogel contendo TIO-R-NC demonstrou ser mais adequado à aplicação tópica de regiões doloridas e injuriadas, características das lesões por micoses.

Após preparação e caracterização, os hidrogéis foram acondicionados em frascos de parede dupla, armazenados à temperatura ambiente e ao abrigo da luz. Após 30 dias, os parâmetros descritos na caracterização dos hidrogéis foram reavaliados e verificou-se uma redução significativa ( $p \leq 0,05$ ) no pH ( $5,69 \pm 0,04$ ), índice de consistência ( $24224 \pm 7074$ ) e fator de espalhabilidade ( $5,95 \pm 0,54$ ) para HG-TIO-NC<sub>COPA</sub>, apresentando-se visivelmente menos viscoso. No entanto, o teor de tioconazol não sofreu alterações significativas ( $p > 0,05$ ). Para o HG-TIO-R-NC<sub>COPA</sub> e o HG-TIO todos os parâmetros avaliados acima permaneceram similares ( $p \leq 0,05$ ). Devido à instabilidade observada para HG-TIO-NC<sub>COPA</sub>, a posterior avaliação em 60 dias prosseguiu-se somente para HG-TIO-R-NC<sub>COPA</sub> e HG-TIO. Em 60 dias de armazenamento, o teor de tioconazol dos HG-TIO-NC<sub>COPA</sub> foi de  $0,90 \pm 0,01$ , ( $p \leq 0,05$ ) enquanto que os outros parâmetros permaneceram constantes ( $p > 0,05$ ). Os HG-TIO não apresentaram mudanças em relação aos parâmetros avaliados ( $p > 0,05$ ).

### 3.7 TAMANHO DE PARTÍCULA

A fim de verificar a integridade das nanopartículas após incorporação nos hidrogéis, os mesmos, após diluição e filtração, foram avaliados por espectroscopia de correlação de fótons. Os resultados demonstraram que a incorporação das nanocápsulas poliméricas nos hidrogéis não causou mudanças em relação à integridade física das mesmas. Após a incorporação, os diâmetros médios de partícula encontrados foram semelhantes àqueles observados para as formulações originais ( $p > 0,05$ ), de  $172 \pm 7$  nm para HG-TIO-NC<sub>COPA</sub> e de  $208 \pm 32$  nm para HG-TIO-R-NC<sub>COPA</sub>. Siqueira e colaboradores (2011) desenvolveram hidrogéis de hidroxietilcelulose contendo nanocápsulas poliméricas revestidas e não revestidas com quitosana e da mesma forma, não evidenciaram danos às nanopartículas após incorporação no semissólido. Estes resultados demonstram a compatibilidade entre as nanocápsulas desenvolvidas e o polímero utilizado.

### 3.8 AVALIAÇÃO DO POTENCIAL BIOADESIVO DOS HIDROGÉIS

Tendo em vista os resultados preliminares de mucoadesão obtidos a partir do ensaio com a solução de mucina, o qual apontou a capacidade bioadesiva das TIO-R-NC<sub>COPA</sub>, estudos subsequentes para a avaliação dos hidrogéis contendo estes nanocarreadores (HG-TIO-R-NC<sub>COPA</sub>) foram conduzidos pelo método de escoamento de líquido e comparadas com HG-TIO. As formulações contendo as nanocápsulas revestidas com o polímero catiônico demonstraram superior capacidade de adesão à superfície de mucina em relação ao hidrogel contendo o fármaco não-associado ( $p \leq 0,05$ ) (Figura 4). Após 10 min de escoamento do líquido sobre os hidrogéis aplicados na camada de mucina,  $78,45 \pm 4,77\%$  da quantidade total de fármaco aplicado, via HG-TIO-R-NC<sub>COPA</sub>, permaneceu retido, ao passo que para o hidrogel contendo o fármaco não associado, a quantidade aderida foi de  $36,55 \pm 5,08\%$ . Os resultados obtidos indicam que as formulações semissólidas contendo as nanocápsulas revestidas com quitosana permaneceram cerca de duas vezes mais retidas na superfície de mucina em relação aos hidrogéis contendo o fármaco não associado. Assim, pode-se inferir que os HG-TIO-R-NC<sub>COPA</sub> apresentam características bioadesivas, pela interação eletrostática entre as cargas positivas da quitosana e a superfície negativa do gel de mucina (RINAUDO, 2006; DASH et al., 2011). Assim, levando-se em consideração a superfície do estrato córneo, dotada de carga negativa, é possível proporcionar um aumento no tempo de contato e de residência do

antifúngico no local de aplicação a partir das formulações semissólidas desenvolvidas neste trabalho.

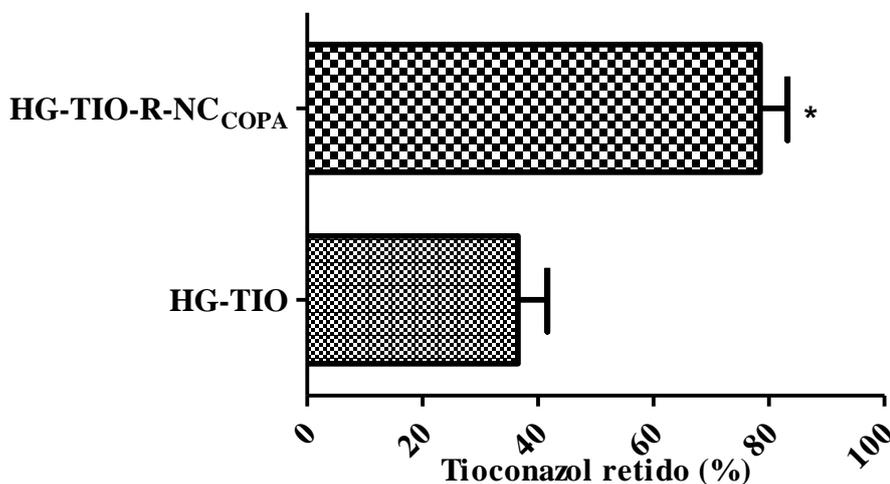


Figura 4. Potencial bioadesivo dos hidrogéis contendo tioconazol associado às nanocápsulas poliméricas revestidas (HG-TIO-R-NC<sub>COPA</sub>) e hidrogéis contendo o fármaco não associado (HG-TIO) em modelo de escoamento de líquido (n=4). \*Estatisticamente diferente ( $p \leq 0,05$ ).

### 3.10 ESTUDOS DE PERMEAÇÃO/PENETRAÇÃO CUTÂNEA *IN VITRO*

A distribuição do tioconazol entre as diferentes camadas da pele suína após aplicação dos hidrogéis foi avaliada *in vitro*. Ao término do estudo, as camadas da pele (estrato córneo, epiderme viável e derme) foram separadas para a quantificação do fármaco em cada uma destas camadas. Variações de concentração em cada camada foram observadas (Figura 5). Para o estrato córneo, os valores de tioconazol encontrados diferiram conforme a formulação aplicada ( $p \leq 0,05$ ) ( $21,18 \pm 2,84 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ ;  $15,47 \pm 0,80 \mu\text{g}/\text{cm}^2$  e  $2,98 \pm 0,35 \mu\text{g}/\text{cm}^2$  para HG-TIO, HG-TIO-R-NC<sub>COPA</sub> e HG-TIO-NC<sub>COPA</sub>, respectivamente). Para o hidrogel contendo o fármaco não associado às nanoestruturas, quantidades superiores de tioconazol foram quantificadas na epiderme viável ( $5,09 \pm 0,62 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ ) em relação aos hidrogéis contendo as nanocápsulas ( $p \leq 0,05$ ) ( $0,89 \pm 0,19 \mu\text{g}/\text{cm}^2$  para HG-TIO-R-NC<sub>COPA</sub> e  $1,27 \pm 0,26 \mu\text{g}/\text{cm}^2$  para HG-TIO-NC<sub>COPA</sub>,  $p > 0,05$ ). Da mesma forma, maiores concentrações de fármaco foram verificadas na derme para HG-TIO ( $18,16 \pm 7,92 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ ) em relação à HG-TIO-R-NC<sub>COPA</sub> e HG-TIO-NC<sub>COPA</sub> ( $p \leq 0,05$ ) que, por sua vez, não diferiram entre si ( $p > 0,05$ ) ( $1,51 \pm 0,42 \mu\text{g}/\text{cm}^2$  e  $0,97 \pm 0,21 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ , respectivamente). Após oito horas de estudo, não foi possível quantificar o fármaco no meio receptor para as formulações contendo os nanocarreadores

(HG-TIO-R-NC<sub>COPA</sub> e HG-TIO-NC<sub>COPA</sub>). No entanto, para o HG-TIO,  $12,93 \pm 2,41 \mu\text{g/mL}$  de tioconazol permeou através da pele, podendo ser quantificada no meio receptor (Figura 5).

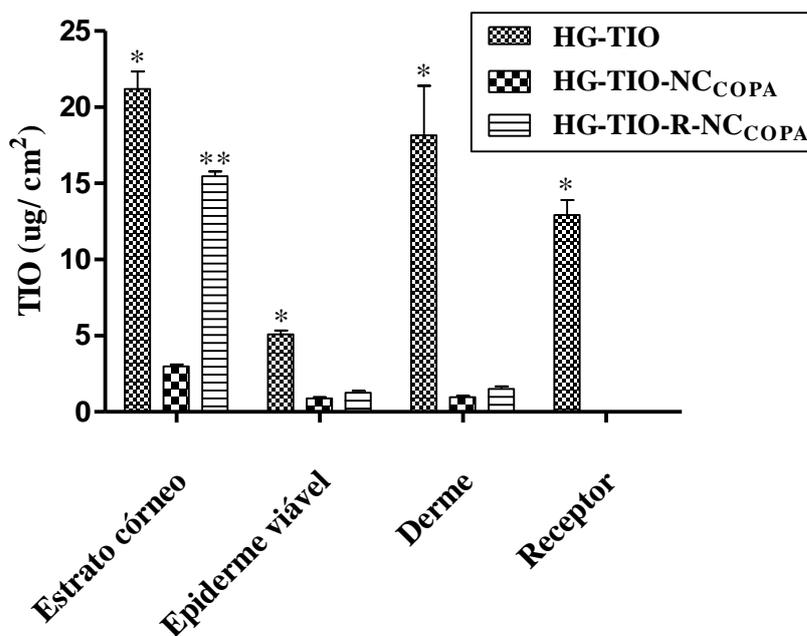


Figura 5. Perfis de penetração do tioconazol a partir dos hidrogéis contendo tioconazol não associado (HG-TIO) e tioconazol associado às nanocápsulas revestidas (HG-TIO-R-NC<sub>COPA</sub>) e não revestidas (HG-TIO-NC<sub>COPA</sub>), nas diferentes camadas cutâneas (n=6, média  $\pm$  EP). \*Estatisticamente diferente ( $p \leq 0,05$ ).

Os resultados demonstram a penetração do tioconazol nas camadas mais profundas da pele, inclusive alcançando o meio receptor quando não associado às nanocápsulas poliméricas. Por outro lado, quando associado às nanocápsulas, o fármaco permaneceu concentrado no estrato córneo, enquanto que quantidades mínimas alcançaram a epiderme e a derme, sendo que neste caso não foi possível a quantificação do mesmo no meio receptor. Uma liberação controlada desempenha papel importante na distribuição do fármaco nas camadas da pele (MONTENEGRO et al., 2012). Assim, levando em consideração os resultados obtidos nos estudos de liberação *in vitro* utilizando sacos de diálise, onde 100% do fármaco já havia sido difundido através do saco de diálise nas primeiras 4 h, quando não associado às nanocápsulas, e quando associado às nanoestruturas, a liberação foi de 20% e 50%, para TIO-NC<sub>COPA</sub> e TIO-R-NC<sub>COPA</sub>, respectivamente, após o mesmo período de tempo, pode-se inferir que diferenças no percentual de tioconazol liberado a partir de cada

formulação acabam influenciando na retenção do fármaco em cada camada cutânea. Sabe-se que o transporte através do estrato córneo ocorre por difusão passiva, entretanto, há um chamado “efeito reservatório”, onde componentes lipofílicos são sequestrados pelo estrato córneo. Neste caso, a substância deve estar suficientemente difundida no estrato córneo para que um efetivo reservatório seja formado, evitando a sua difusão para a epiderme viável (JEPPS et al., 2013). Assim, o controle de liberação exercido pelas nanocápsulas permitiu que o fármaco, de natureza altamente lipofílica, se difundisse no estrato córneo, resultado do efeito reservatório formado. Este efeito foi mais pronunciado para as nanocápsulas revestidas, provavelmente por estas, no tempo do estudo, liberarem uma quantidade maior de tioconazol em relação às não-revestidas. Soma-se a isso a presença do polímero catiônico, conferindo bioadesividade à formulação. Isto pode explicar o efeito de retenção do fármaco no estrato córneo promovido pelo nanoencapsulamento catiônico. O mesmo efeito não foi observado para os hidrogéis contendo o fármaco não-associado, uma vez que houve a permeação cutânea do mesmo, alcançando o meio receptor.

Outros estudos acerca da penetração de fármacos liberados a partir de nanocarreadores na pele demonstraram resultados semelhantes. Um estudo *in vivo* de permeação percutânea utilizando porcos da índia comparou a aplicação tópica de creme e solução, ambos contendo 1% de tioconazol e demonstrou que independente da formulação, o fármaco apresentou altas concentrações no estrato córneo; entretanto, altas concentrações foram também observadas na epiderme e derme (SOBUE; SEQUIGUCHI, 2004). Gupta e Vyas (2012) observaram maiores níveis de retenção cutânea, com predominância no estrato córneo, quando fluconazol estava associado a nanopartículas lipídicas em relação ao fármaco em solução. Em estudo avaliando a influência do revestimento de nanocápsulas com quitosana, os autores atribuíram a redução de permeação da benzofenona-3 através da pele e o prolongado tempo de residência do filtro à presença do revestimento catiônico (SIQUEIRA et al., 2011). Nanocápsulas de PCL e óleo de copaíba e carreadores lipídicos também contendo o óleo foram desenvolvidas para liberação cutânea de imiquimode (VENTURINI et al., 2015) e foi observado que as nanocápsulas poliméricas permitiram uma maior concentração do fármaco no estrato córneo em relação às nanopartículas lipídicas.

A problemática no que diz respeito à terapia tópica de dermatofitoses concentra-se no baixo tempo de residência dos fármacos antifúngicos no local de ação, presença de efeitos adversos e a permeabilidade variável dos mesmos (SOUZA et al., 2012). Assim, a bioadesividade comprovada pelo estudo de escoamento de líquido e o direcionamento do tioconazol para o estrato córneo, sítio de instalação e desenvolvimento dos fungos

dermatófitos, com mínima penetração para as camadas mais profundas como epiderme viável e derme, proporcionados pelo HG-TIO-R-NC<sub>COPA</sub>, são resultados promissores, uma vez que podem melhorar a eficácia do tratamento com redução dos efeitos adversos como as dermatites de contato, que têm origem a partir da exposição da epiderme à agentes irritantes.

#### 4 CONCLUSÃO

O presente capítulo demonstrou a viabilidade tecnológica de obtenção de nanocápsulas poliméricas de óleo de copaíba, revestidas e não-revestidas com quitosana visando a liberação tópica de tioconazol. A veiculação do tioconazol nas nanocápsulas poliméricas proporcionou o controle na liberação do fármaco e a manutenção da sua atividade antifúngica, bem como a redução do potencial irritante do tioconazol. Os hidrogéis contendo as nanocápsulas revestidas demonstraram ser candidatos em potencial para o tratamento tópico de micoses superficiais, uma vez que apresentaram características adequadas à aplicação cutânea, bem como potencial bioadesivo, o que pode garantir um aumento no tempo de permanência na pele e o direcionamento do fármaco ao local específico da infecção fúngica, o estrato córneo.

#### Agradecimentos

Fernanda C. Flores agradece à Fundação de Amparo à Pesquisa do Rio Grande do Sul, FAPERGS e à Coordenação de Aperfeiçoamento Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa de estudos.

#### REFERÊNCIAS

- BEGGS, W. H. Fungicidal activity of tioconazole in relation to growth phase of *Candida albicans* and *Candida parapsilosis*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, p. 699-701, 1984.
- BORGHETTI, G.S., KNORST, M.T. Desenvolvimento e avaliação da estabilidade física de loções O/A contendo filtros solares. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 42, p. 531-537, 2006.
- BRASIL, 2010, Farmacopéia Brasileira V.
- COSTA, P.; LOBO, J. M. S. Modeling and comparison of dissolution profiles. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 13, p. 123-133, 201.

CARVALHO, C.F.; CHORILLI, M.; GREMIÃO, D.P.M. Plataformas Bio(Muco) Adesivas Poliméricas Baseadas em Nanotecnologia para Liberação Controlada de Fármacos - Propriedades, Metodologias e Aplicações. **Polímeros**, v.24, n.2, p.203-213, 2014.

DASH, M; CHIELLINI, F.; OTTENBRITE, R. M.; CHIELLINI, E. Chitosan- A versatile semi-synthetic polymer in biomedical applications. **Progress in Polymer Science** 36 (2011) 981–1014.

FESSI, H. et al. Nanocapsule formation by interfacial polymer deposition following solvent displacement. **International Journal of Pharmaceutics**, v.55, n. 1, p. R1-R4, 1989.

FDA (2001). Guidance for Industry, Bioanalytical Method Validation. **Food and Drug Administration** 1-22.

FONSECA, F. N. et al. Mucoadhesive Amphiphilic Methacrylic Copolymer-Functionalized Poly( $\epsilon$ -caprolactone) Nanocapsules for Nose-to-Brain Delivery of Olanzapine. **Journal of Biomedical Nanotechnology**, v.. 11, p. 1–10, 2014

GARG, A.; AGGARWAL, D.; GARG, S.; SINGLA, A. Spreading of semisolid formulations. **Pharmaceutical Technology**, v. 26, p. 84-105, 2002.

GUPTA, A. K.; CHAUDHRY, M.; ELEWSKI, B. Tinea corporis, tinea cruris, tinea nigra, and piedra. **Dermatologic Clinics**, v. 21, p. 395-400, 2003.

GUPTA, M.; VYAS, S. P. Development, characterization and in vivo assessment of effective lipidic nanoparticles for dermal delivery of fluconazole against cutaneous candidiasis. **Chemistry and Physics of Lipids**, v. 165, p. 454– 461, 2012.

GUIN, J.; KINCANNON, J. Medication-induced contact reactions. **Clinics in Dermatology**, v. 15, p. 511-525, 1997.

HADJI-MINAGLOU, F.; BOLCATO, O. The potential role of specific essential oils in the replacement of dermacorticoid drugs (strong, medium and weak) in the treatment of acute dry or weeping dermatitis. **International Journal of Aromatherapy**, 15 (66-73), 2005.

HÄRTER, A. P. G. et al. Development of a method for determination of tioconazole associated with polymeric nanocapsules by liquid chromatography. **Quimica Nova**, v. 37, p. 996-999, 2014.

JAYATILAKE, J. A. M. S.; TILAKARATNE, W. M.; PANAGODA, G. J. Candidal onychomycosis: A Mini-Review. **Mycopathologia**, v. 168, p. 165-173, 2009.

JEPPE, O. G.; DANCİK Y.; ANISSIMOV, Y. G.; ROBERTS, M. S. Modeling the human skin barrier-Towards a better understanding of dermal absorption. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 65, p. 152 –168, 2013.

JERVONS, S. et al. Antifungal activity of tioconazole (UK-20,349), a new imidazole derivative. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 5, p. 597-602, 1979.

KAUR, K. et al. Regulations in Nanotechnology: A Brief Review. **Journal of Pharmacy Research**, v. 3, n. 9, p. 2083-2087, 2010.

KANBE, T. Molecular Approaches in the Diagnosis of Dermatophytosis. **Mycopathologia**, v. 166, p. 307-317, 2008.

KIM, J.; SONG, J.; LEE, E.; PARK, S. Rheological properties and microstructures of Carbopol gel network system. **Colloid Polymer Science**, v. 281, p. 614–623, 2003.

LACAZ, C. S. et al. Tratado de micologia médica- São Paulo, **Editora Sarvier**, 2002.

LEE, C. H.; MOTURI, V.; LEE, Y. Thixotropic property in pharmaceutical formulations. *Journal of Control Release*, v. 136, p. 88-98, 2009.

LIMA, J. A. **Desenvolvimento de hidrogéis mucoadesivos contendo nanocapsulas de clotrimazol para o tratamento de candidíase vulvovaginal**. Dissertação de Mestrado, 2015. Mestrado em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal de Santa Maria, 87 p.

LUPKE, N. P. Hen's egg chorioallantoic membrane test for irritation potential. **Chemical Toxicology**, v. 23, n. 2, p. 287-291, 1985.

MARTINEZ-ROSSI, N. M.; PERES, N. T. A.; ROSSI, A. Antifungal resistance mechanisms in dermatophytes. **Mycopathologia**, v. 166, p. 369–383, 2008.

MIGNON, B. et al. Immunization and dermatophytes. **Current Opinion in Infectious Diseases**, v. 21, p. 134–140, 2008.

MILAN, A. L. K.; MILÃO, D.; SOUTO, A. A. CORTE, T. W. F. Estudo da hidratação da pele por emulsões cosméticas para xerose e sua estabilidade por reologia. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 43, p. 649-657, 2007.

MISHRA, B. et al. Colloidal nanocarriers: a review on formulation technology, types and applications toward targeted drug delivery. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine**, v. 6, p. 9–24, 2010.

MONTENEGRO, L.; SINICO, C.; CASTANGIA, I.; CARBONE, C.; PUGLISI, G. Idoxuridine-loaded solid lipid nanoparticles for drug delivery to the skin. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 434, p. 169, 2012.

NIELSEN, L.S.; SCHUBERT, L.; HANSEN, J. Bioadhesive drug delivery systems. Characterisation of mucoadhesive properties of systems based on glyceryl mono-oleate and glyceryl monolinoleate. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v.6,p.231-239,1998

NYIRJESY, P. Vulvovaginal candidiasis and bacterial vaginosis. **Infectious Disease Clinics of North America**, v. 22, p. 637–652, 2008.

OLIVEIRA, C. P. et al. An algorithm to determine the mechanism of drug distribution in lipid-core nanocapsule formulations. **Soft Matter**, v. 9, p. 1141-1150, 2013.

- PIERI, F. A.; MUSSI, M. C.; MOREIRA, M. A. S. Óleo de copaíba (*Copaifera* sp.): histórico, extração, aplicações industriais e propriedades medicinais. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v.11, n. 4, p. 465-472, 2009.
- POHLMANN, A. R. et al. Poly( $\epsilon$ -caprolactone) microcapsules and nanocapsules in drug delivery. **Expert Opinion on Drug Delivery**, v. 10, n. 5, p. 623-638, 2013.
- RIGO, L.A; WEBER, J; SILVA, C.B; BECK, R.C.R. Evaluation of the spreadability of pharmaceutical or cosmetic semisolid formulation using scanned imaged. **Latin American Journal of Pharmacy**, v.31, n.10, p.1389-1391, 2012.
- RINAUDO, M. Chitin and chitosan: properties and applications. **Progress in Polymer Science**, v. 31, p. 603–632, 2006.
- SCHREML, S. et al. The impact of the pH value on skin integrity and cutaneous wound healing. **Journal of the European Academy of Dermatology and Vanereology**, v. 24, p. 373-378, 2010.
- SIDRIM, J. J. C.; ROCHA, M. F. G. Micologia médica a luz de autores contemporaneos. **Editora Guanabara Koogan S.A.** Copyright. Rio de Janeiro, RJ, 2004.
- SIEPMANN, J.; SIEPMANN, F. Mathematical modeling for drug delivery. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 364, p. 328–343, 2008.
- SIQUEIRA, N. M. **Desenvolvimento tecnológico e avaliação de penetração cutânea de benzofenona-3 a partir de nanocápsulas revestidas com quitosana**. 106 p. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, 2008.
- SIQUEIRA, N. M.; CONTRI, R. V.; PAESE, K.; BECK, R. C. R.; POHLMANN, A. R.; GUTERRES, S. S. Innovative Sunscreen Formulation Based on Benzophenone-3-Loaded Chitosan-Coated Polymeric Nanocapsules. **Skin Pharmacology and Physiology**, v. 24, p. 166–174, 2011.
- SOBUE, S.; SEKIGUCHI, K. Difference in percutaneous absorption and intracutaneous distribution in guinea pigs among topical antifungal drugs (tioconazole solution,tioconazole cream, miconazole nitrate solution and bifonazole solution). **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, v. 27, n. 9, p. 1428-1432, 2004.
- SONNEX, C. Genital allergy. **Sexually Transmitted Infection**, v. 80, p. 4-7, 2004.
- SOUZA, A. L. R. et al., Nanotechnology-based Drug Delivery Systems for Dermatomycosis Treatment. **Current Nanoscience**, v. 8, p. 512-519, 2011.
- SPIELMANN, H. Ocular Irritation. In: **In vitro methods in pharmaceutical research**, 1997, cap. 12, p. 265-287.
- STUBB, S. et al. Contact allergy to tioconazole. **Contact Dermatitis**, v. 26, n. 3, p. 155-158, 1992.

SVETLICHNY, G. et al. Solid lipid nanoparticles containing copaiba oil and allantoin: development and role of nanoencapsulation on the antifungal activity. **Die Pharmazie (Berlin)**, v. 70, p. 155-164, 2015.

SWEETMAN, S. C. **Martindale**: Guia Completa de Consulta Fármaco-Terapéutica. 2ª ed. Barcelona: Pharma Editores, S.L. p. 588, 2006.

TAKEUCHI, H.; THONGBORISUTE, J.; MATSUI, Y.; SUGIHARA, H.; YAMAMOTO, H.; KAWASHIMA, Y. Novel mucoadhesion tests for polymers and polymer-coated particles to design optimal mucoadhesive drug delivery systems. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v.57, p.1583-1594, 2005.

VEIGA JUNIOR, V. F.; PINTO, A. C. O Gênero *Copaifera* L. **Quimica Nova**, v. 25, n. 2, p. 273-286, 2002.

VENTURINI, C. G. et al. Co-encapsulation of imiquimod and copaiba oil in novel nanostructured systems: promising formulations against skin carcinoma. **Pharmaceutical Sciences**, v. 79, p. 36 –43, 2015.

WEISS-ANGELI, V. et al. Nanocapsules of octyl methoxycinnamate containing quercetin delayed the photodegradation of both components under ultraviolet A radiation. **Journ Biomedical Nanotechnology**, v. 4, p. 80-89, 2008.



### **CAPÍTULO 3:**

**Óleos essenciais para o tratamento tópico de onicomicoses: mini-revisão**

**Mycopathologia DOI 10.1007/s11046-015-9957-3**

---



## **CAPÍTULO 3: Óleos essenciais para o tratamento tópico de onicomicoses: mini-revisão**

### **3.1 Introdução**

O presente capítulo deu início à segunda problemática levantada neste trabalho, o tratamento tópico de onicomicoses. A parte inicial desta segunda etapa compreendeu a elaboração de um artigo de revisão, o qual encontra-se publicado na Revista Mycopathologia DOI 10.1007/s11046-015-9957-3 (FLORES; BECK; SILVA, 2016), que contempla a utilização de óleos essenciais para o tratamento de onicomicoses. A busca concentrou-se em dados da literatura dos últimos dez anos.

# Essential Oils for Treatment for Onychomycosis: A Mini-Review

Fernanda C. Flores · Ruy C. R. Beck ·  
Cristiane de B. da Silva

Received: 24 July 2015 / Accepted: 9 October 2015 / Published online: 19 October 2015  
© Springer Science+Business Media Dordrecht 2015

**Abstract** Onychomycosis are fungal infections affecting finger and toenails mainly caused by dermatophyte fungi and some *Candida* species. Low cure rates and frequent recurrence, development of a fungal resistance front to various antimicrobial agents topical and systemic, and an ineffective topical treatment make onychomycosis difficult to treat. Essential oils are excellent candidates for the topical treatment for onychomycosis because the development of resistance by fungi is rare, and the presence of side effects is low. They are composed of a complex variety of compounds, mainly terpenes, with low molecular weight, which may easily penetrate into the nail plate, finding the fungi elements. The complex mixture confers a broad antifungal spectrum of action, through interaction with biological membranes, interference in

radical and enzymatic reaction of fungi cells. Essential oils may become the source of new therapeutic molecules, and the use of an essential oil incorporated into a topical formulation is an interesting, safe, and effective alternative for the treatment for onychomycosis. However, studies are needed to evaluate the efficacy of essential oils in the treatment for onychomycosis in vivo. This mini-review aims to present the potential use of essential oils for the treatment for onychomycosis, focusing on the last decade.

**Keywords** Essential oil · Onychomycosis · Antifungal · Topic treatment · Terpenes

## Introduction

Onychomycosis are fungal infections of the finger or toenails, mainly caused by fungi of genera *Trichophyton*, *Microsporum*, and *Epidermophyton*, and some *Candida* species. The predominant agent is *T. rubrum*, which is found in 60 % of these kinds of infections. The affected nails become brittle, thin, disfigured, and dyschromic [1]. This serious problem deserves attention because untreated cases have the potential to lead to serious complications such as ulceration of the feet and legs, with cases of amputations of these members [2]. This situation becomes more problematic in the case of immunosuppressed people. It is critical to treat onychomycosis for medical and cosmetic purposes. However, the rate of cure is low, and the recurrence

---

F. C. Flores · C. B. da Silva  
Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas,  
Universidade Federal de Santa Maria, Av. Roraima, 1000,  
Santa Maria, RS 97105-900, Brazil

R. C. R. Beck  
Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas,  
Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Av. Ipiranga,  
2752, Porto Alegre, RS 90610-000, Brazil

C. B. da Silva (✉)  
Departamento de Farmácia Industrial, Curso de Farmácia,  
Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal de  
Santa Maria, Av. Roraima, 1000, Santa Maria,  
RS 97105-900, Brazil  
e-mail: csbona@smail.ufsm.br

rates are high, which often makes onychomycosis a chronic condition [3].

The available therapies for onychomycosis consist of oral and topical allylamines, azoles, benzoxaboroles, ciclopirox, and amorolfine. These conventional therapies present severe adverse effects, and often, the development of microbial resistance front to various antimicrobial agents [1, 3]. This drawback can be overcome by the use of other types of therapies such as the use of medicinal plants as a complementary and alternative medicine. Essential oils, obtained from plants, have been used through popular medicine, mainly due to their topical antiseptic properties. Nowadays, the use of essential oils is recognized and well accepted in academia and industrial pharmacy, generating impressive reports about their antimicrobial activity in the scientific and medical literature [4].

Essential oils, also called plant oils, are natural, volatile, complex, and multi-component. They are composed of a mixture of 20–60 components, while some of them may contain up to 100 compounds. This complex variety of compound, in their majority, monoterpenes, sesquiterpenes, and nonterpenaceous components, provides a broad spectrum of action against fungal, bacterial, and virus [4]. In addition, they have the advantage of being resistant to microbial adaptation, because their mechanism of action may reach different parts of the microbial cell [5]. They can be used in their pure form or incorporated into pharmaceutical dosage forms, complementing or even replacing the conventional therapeutics.

Several studies have reported the use of essential oils to treat infections caused by dermatophyte fungi. Extensive researches have been carried out in order to prove the antifungal action of essential oils as well as to elucidate the possible mechanisms of action. The activity of essential oils particularly against those etiological agents of onychomycosis such as *Trichophyton rubrum*, *T. mentagrophytes*, and *Candida* species is well described in the literature. This mini-review is focused on the research related to the use of essential oils for the treatment for onychomycosis over the last decade.

### Mechanism of Antifungal Action of Essential Oils

Essential oils are a mixture of up to 100 components, depending on the specie. However, they are

characterized by the major compounds (two, three, or more), which are generally responsible for the biological activities [5]. The mode of action, due to the mixture, is complex and does not involve just one mechanism [4]. Furthermore, there are several studies presenting a synergism among the various compounds [6, 7]. However, their interaction with biological membranes leading to an alteration on cell selective permeability seems to be the predominant action [5]. Monoterpenes are able to act through ergosterol-binding causing a destabilization of fungal membranes [8] and inhibition of sporulation [9]. Some components may act through interference in different kinds of radical reactions, reducing the activity of mitochondrial enzymes [10], producing an enzymatic reaction with the cell wall [7], and inhibiting cellular metabolism [11]. More specifically to *Candida* species, essential oils inhibit S phase of cell replication and inhibit the morphological transition of the germ tube or, converting the most pathogenic form to yeast form through inhibition of glucan synthase, reducing the virulence and pathogenicity [10].

### Essential Oils Studied as Topical Treatment for Onychomycosis

Faced with the need for an effective topical therapy and the emergence of resistance to antifungal drugs, the challenge is to find a treatment capable of acting by different mechanisms at fungal cell level [3]. Thus, essential oils are excellent candidates to fill this lacuna, as there are studies reporting that even against strains resistant to fluconazole, essential oils continue to demonstrate activity, indicating that the defense mechanism developed did not interfere with the antifungal action [10]. It is important to note that for the majority of the studies, when comparing the activities of essential oils against different onychomycosis etiological agents, those dermatophyte fungi were the most susceptible strains even when compared with yeasts and filamentous fungi [6, 8]. In Table 1 are shown the values of minimum inhibitory concentration (MIC) of essential oils front to the main causative pathogens of onychomycosis. Moreover, dermatophyte fungi are severely affected by essential oils rich in phenylpropanoids and monocyclic sesquiterpenes [12]. Details regarding the main oils with potential for the topical treatment for onychomycosis are presented below.

**Table 1** Minimal inhibitory concentration of essential oils for main etiological agents of onychomycosis: *C. albicans*, *T. mentagrophytes*, and *T. rubrum*

Essential oil	Etiological agent	MIC	References
Clove oil	<i>C. albicans</i>	0.64*	[27]
		400**	[9]
	<i>T. mentagrophytes</i>	0.16*	[27]
		500**	[9]
		0.16*	[27]
		1000**	[27]
Melaleuca oil	<i>C. albicans</i>	0.6–80*	[41]
		1.1–4.4*	[41]
	<i>T. mentagrophytes</i>	1000**	[27]
		0.3–6*	[41]
		1*	[19]
		1000**	[27]
Thyme oil	<i>C. albicans</i>	0.32–0.64*	[23]
		0.0625–0.25*	[15]
	<i>T. mentagrophytes</i>	0.16–0.32*	[23]
		0.16–0.32*	[23]
Lavender oil	<i>C. albicans</i>	3200**	[9]
	<i>T. mentagrophytes</i>	2000**	[27]
	<i>T. rubrum</i>	500**	[27]
Eucalyptus oil	<i>T. mentagrophytes</i>	250*	[27]
	<i>T. rubrum</i>	<125**	[27]
Oregano oil	<i>C. albicans</i>	0.32–1.25*	[36]
	<i>T. mentagrophytes</i>	0.32–1.25*	[36]
	<i>T. rubrum</i>	0.16–1.25*	[36]

\* MIC determined by macrodilution method and expressed in mL mL<sup>-1</sup>

\*\* MIC determined by macrodilution method and expressed in mg mL<sup>-1</sup>

### Clove Oil

Also known as clove oil, the essential oil of *Eugenia caryophyllata* (*Zyzygium aromaticum*) has been used since ancient times due to its antiseptic properties. Owing to its wide use in nail formulations or its incorporation into varnish bases for the treatment of weakened nails and fungal infections, many studies about its activity against causative agents of onychomycosis have been carried out. The antidermatophytic activity of clove oil and eugenol was verified and showed powerful activity (fungistatic and fungicidal effect) against *M. canis*, *M. gypseum*, *T. rubrum*, *T. mentagrophytes*, and *E. floccosum* isolated from nails and skin [13]. Against 10 species of *Candida* clinical isolates, it showed to be more effective than amphotericin B [14]. When the antifungal activity was tested in onychomycosis clinical isolates of *Scopulariopsis brevicaulis*, *Fusarium oxysporum* [15], *T. rubrum*, and *T. mentagrophytes* [15, 16], the oil was effective. Besides, the oil and one of its major constituents, eugenol, showed antifungal activity

against five clinical isolates from onychomycosis, including *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. krusei*, *T. rubrum*, and *T. mentagrophytes* [16].

### Melaleuca Alternifolia Essential Oil (TTO)

TTO was discovered by Australian aborigines, and due to its antiseptic properties, it has been used since ancient times, among others, embedded in topical nail creams. It is indicated for onychomycosis caused by *Candida* species [17]. Melaleuca oil has been extensively studied and has performed well in in vivo experiments demonstrating its effectiveness for treatment for onychomycosis [18, 19]. The minimal inhibition concentration of TTO for *T. rubrum* was determined as 0.1 % (v/v) [20]. The oil showed fungicidal effect against *T. mentagrophytes* after 3 h of vapour contact [21]. Flores et al. [22] proved the activity of TTO, associated in nanocapsules, in the control of the growth of *T. rubrum* in an onychomycosis in vitro model. TTO is also one of the components of a commercial formula Tineacide® by Blaine

Labs Inc., for the treatment for onychomycosis. The strong antiseptic activity of this oil is attributed to its major constituent terpinen-4-ol, [18].

#### Essential Oils from *Thymus* spp

Thyme oil, obtained from *Thymus vulgaris*, is one of the more antimicrobially active plant oils. Thyme essential oil shows a strong antifungal activity even against clinical isolates from onychomycosis [6]. All species of thyme are sources of essential oils rich in thymol and carvacrol, which are primarily responsible for the oil antimicrobial activity [23]. Unsurprisingly, when different essential oils were compared regarding their antifungal activity, those containing thymol and carvacrol (thyme and clove oils) showed the strongest activity [15]. Even when comparing different chemotypes of thymus oil against clinical isolates from onychomycosis, the samples presenting higher amounts of carvacrol and thymol were more active [24]. Gollucci et al. [25] tested thymus oil against fluconazole-resistant *Candida* species, and both the oils, as its isolated constituents (carvacrol, thymol, and eugenol), were fungicidal, suggesting that the oil or its isolated products may be an alternative to fluconazole therapy. In a study conducted with 39 patients presenting paronychia (*Candida* spp. and *Fusarium* spp. were isolated from the lesions), a solution of thyme essential oil in chloroform was applied, and around 60 % of relief and 15 % of cure were related after 3 months of treatment [26]. In addition, studies reported an additional interaction between carvacrol and thymol, increasing their own antifungal activity [23].

#### Essential Oils from *Lavandula* spp

*Lavandula* genus includes more than 20 species. The variety most commonly used for its medicinal properties is *Lavandula augustifolia* [27]. Its antifungal properties have been studied over the years. Lavender essential oil showed antifungal activity against two clinical isolates from onychomycosis (*Scopulariopsis brevicaulis* and *Fusarium oxysporum*) and against another 42 strains [15] including dermatophyte fungi [15, 28]. Authors attribute the antifungal activity to major constituents: linalool, linalyl acetate,  $\beta$ -caryophyllene, and terpinen-4-ol. Moreover, the oil proved to be active front to *Candida* species [9]. Experiments

about the antifungal activity of *L. viridis* [11] and *L. luisieri* [29] were conducted for three onychomycosis isolate strains, three candidiasis isolates, and four dermatophyte strains and demonstrate strong antifungal activity, mainly for dermatophytes. This oil is one of the constituents of Tineacide<sup>®</sup>.

#### Essential Oils from *Eucalyptus* spp

Many studies about antifungal activity of essential oils extracted from *Eucalyptus* species have been conducted and showed an excellent and strong activity against various pathogenic fungi and yeasts [30], including clinical isolates of *F. oxysporum* [31], *C. albicans*, *T. rubrum*, *T. soudanense* [32]. In all cases, the activity was attributed to 1.8 cineol, the major constituent. Eucalyptus oil is part of the Vick's VapoRub<sup>™</sup> medicine, a chest rub indicated for respiratory diseases, and due to its "folk uses" for the treatment for onychomycosis. Ramsewak et al. [33] isolated the monoterpenes camphor, thymol, menthol, and eucalyptus oil from the remedy and evaluated them against 16 strains that cause onychomycosis. The authors suggested that, since the major constituent of the essential oil is a monoterpene, mixtures of different monoterpenes in a similar composition should be considered as a potential candidate to treat onychomycosis. This potential activity was confirmed in an in vivo study with patients presenting positive cultures for *C. parapsiolis* and *T. mentagrophytes*. After 48 weeks, applying Vick's VapoRub<sup>™</sup>, once a day, 15 of 18 volunteers presented improvement and about 30 % were cured [34].

#### Oregano Oil

The existence of different chemotypes of *Origanum vulgare* is well known: carvacrol, cariphylene, spathulenol, among others, and all chemotypes present antifungal activity, but in different degrees. The most antifungal active chemotypes are those that present carvacrol and thymol as major compounds [35]. Sahin et al. [36] verified the antidermatophytic activity of oregano oil against 15 strains of fungi including *C. albicans*, *F. oxysporum*, *T. rubrum*, and *T. mentagrophytes* and for clinical isolates from onychomycosis [37]. Inouye et al. [21] found that oregano oil was the most active against *T. mentagrophytes*, when compared with melaleuca, oregano, and lavender oils.

## Others

In a study conducted by Pinto et al. [38], the antifungal activity of essential oil from *Salvia officinalis*, rich in monoterpenes, was verified against several strains of fungi and yeasts, including clinical isolates from nails and skin (*T. rubrum*, *T. mentagrophytes*, *E. floccosum*, *M. canis*, and *M. gypseum*). Values of MIC for *T. rubrum* and *T. mentagrophytes* were 0.63–1.25  $\mu\text{L mL}^{-1}$ , and the dermatophyte strains were more susceptible to the oil when compared to yeasts and filamentous fungi. Another study showed antifungal activity for *M. canis*, *E. floccosum*, *T. rubrum*, and *T. mentagrophytes* of essential oils from *Prunus armeniaca*, *Prunus dulcis*, *Olea europaea*, and *Mentha piperita* [39].

The treatment for onychomycosis is difficult due to the compact structure of keratin fibers, which leads to a low accessibility of antifungals to the infected tissue [1]. Thus, in order to have the desired efficacy in topical treatment, it is necessary that the antifungal penetrates and reaches the fungus. Essential oils are advantageous in that their active compounds have low molecular weights, leading to an easier penetration through the nail plate. Miron et al. [40] investigated the ability of some constituents of essential oils, monoterpenes (geranial, neral) to cross bovine hoof and their antifungal activity against three potential onychomycosis agents, *M. canis*, *T. rubrum*, and *T. mentagrophytes*, predicting their efficacy index for nail plate. The results showed a higher potential of geranial for the treatment for onychomycosis, even higher than terbinafine and miconazole. The authors concluded that the lower the molecular weight, the greater the penetration. In another study, antifungal activity of geranial, geraniol, neral, geranial, and citral was shown against five *Candida* species and dermatophytes including *T. rubrum*, *T. mentagrophytes*, *M. canis*, and *M. gypseum* with the greatest activity against dermatophytes [8].

## Commercial Formulations Containing Essential Oils for Treatment for Onychomycosis

As reported before, the essential oils are constituents of commercial topical formulations for the treatment for onychomycosis. Tineacide<sup>®</sup> by Blaine Labs (California, USA) has in its formula tea tree oil and lavender oil, among other active ingredients [41].

Carvacrol is the main constituent of a commercial formulation for nail treatment called Fungus Stop factored by Zane Hellas (Thessaloniki, Greece). In addition, Vick's VapoRub<sup>®</sup> (Procter & Gamble, EUA), which was developed for respiratory problems, has been used in popular medicine to treat onychomycosis. It is important to highlight the difficulty found on developing formulations containing essential oils. They present problems such as interactions with packaging materials due to their physicochemical properties such as volatility and instability due to different external factors [19], which leads to a shortage of products that carry such oils in the formulation.

## Conclusion

Essential oils may become the source of new therapeutic molecules and also their incorporation into topical formulation an interesting, safe, and effective alternative for the treatment for onychomycosis. Since essential oils are rich in molecules with low molecular weight, their active substance could provide improved penetration and reach the fungal elements inside the nail plate. More studies are needed to prove the penetration of active compounds into nail plate and in vivo efficacy to treat onychomycosis. The development of new formulations containing essential oils should be taken into account worldwide by researchers and pharmaceutical industries.

**Acknowledgments** Fernanda thanks to Coordenação de Aperfeiçoamento Pessoal de Ensino Superior (CAPES), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), and to Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS) for her scholarship. In addition, the authors thank to Susan Reid for English support.

## References

1. Murdan S. Enhancing the nail permeability of topically applied drugs. *Expert Opin Drug Deliv.* 2008;5:1267–82.
2. Gupta AK, Tu LQ. Therapies for onychomycosis: a review. *Dermatol Clin.* 2006;24:375–9.
3. Gupta AK, Simpson FC. New pharmacotherapy for the treatment of onychomycosis: an update. *Expert Opin Pharmacother.* 2015;16(2):227–36.
4. Hammer KA, Carson CF. Antibacterial and antifungal activities of essential oils. In: Thormar H, editor. *Lipids and essential oils as antimicrobial agents*. Chichester, UK: John Wiley & Sons, Ltd; 2011. p. 255–95.

5. Bakkali F, Averbeck S, Averbeck D, Idaomar M. Biological effects of essential oils: a review. *Food Chem Toxicol.* 2008;46:446–75.
6. Pinto E, Pina-Vaz C, Salgueiro L, Gonçalves MJ, Costa-de-Oliveira S, Cavaleiro C, Palmeira A, Rodrigues A, Martinez-de-Oliveira J. Antifungal activity of the essential oil of *Thymus pulegioides* on *Candida*, *Aspergillus* and *dermatophyte* species. *J Med Microbiol.* 2006;55:1367–73.
7. Yahyazadeh M, Omidbaigi R, Zare R, Taheri H. Effect of some essential oils on mycelial growth of *Penicillium digitatum*. *World J Microbiol Biotechnol.* 2008;24:1445–50.
8. Miron D, Battisti F, Silva FK, Lana AD, Pippi B, Casanova B, Gnoatto S, Fuentesfria A, Mayorga P, Schapoval EES. Antifungal activity and mechanism of action of monoterpenes against dermatophytes and yeasts. *Rev Bras Farmacogn.* 2014;24:660–7.
9. Inouye S, Takahashi M, Abe S. Inhibitory activity of hydrosols, herbal teas and related essential oils against filament formation and the growth of *Candida albicans*. *Jpn J Med Mycol.* 2009;50:243–51.
10. Pinto E, Hrimpeng K, Lopes G, Vaz S, Gonçalves MJ, Cavaleiro C, Salgueiro L. Antifungal activity of *Ferulago capillaris* essential oil against *Candida*, *Cryptococcus*, *Aspergillus* and *dermatophyte* species. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2013;32:1311–20.
11. Zuzarte M, Gonçalves MJ, Cavaleiro C, Canhoto J, Vale-Silva L, Silva MJ, Pinto E, Salgueiro L. Chemical composition and antifungal activity of the essential oils of *Lavandula viridis* L'Hér. *J Med Microbiol.* 2011;60:612–8.
12. Raut JS, Karuppaiyl SM. A status review on the medicinal properties of essential oils. *Ind Crop Prod.* 2014;62:250–64.
13. Pinto E, Vale-Silva L, Cavaleiro C, Salgueiro L. Antifungal activity of the clove essential oil from *Syzygium aromaticum* on *Candida*, *Aspergillus* and *dermatophyte* species. *J Appl Microbiol.* 2009;58:1454–62.
14. Chaieb K, Zmantar T, Ksouri R, Hajlaoui H, Mahdouani K, Abdelly C, Bakhrouf A. Antioxidant properties of the essential oil of *Eugenia caryophyllata* and its antifungal activity against a large number of clinical *Candida* species. *Mycoses.* 2007;50:403–6.
15. Tullio V, Nostro A, Mandras N, Dugo P, Banche G, Cannatelli MA, Cuffini AM, Alonzo V, Carlone NA. Antifungal activity of essential oils against filamentous fungi determined by broth microdilution and vapour contact methods. *J Appl Microbiol.* 2007;102:1544–50.
16. Gayoso CW, Lima EO, Oliveira VT, Pereira FO, Souza EL, Lima IO, Navarro DF. Sensitivity of fungi isolated from onychomycosis to *Eugenia caryophyllata* essential oil and eugenol. *Fitoterapia.* 2005;76:247–9.
17. Martins N, Ferreira ICFR, Barros L, Silva S, Henriques M. Candidiasis: predisposing factors, prevention, Diagnosis and alternative treatment. *Mycopathologia.* 2014;177:223–40.
18. Finch JJ, Warshaw EM. Toenail onychomycosis: current and future treatment options. *Dermatol Ther.* 2007;20:31–46.
19. Carson CF, Hammer KA, Riley TV. *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil: a review of antimicrobial and other medicinal properties. *Clin Microbiol Rev.* 2006;19(1):50–62.
20. Bengel S, Townsend P, Ashford RL, Lambert P. An in vitro study to determine the minimum inhibitory concentration of *Melaleuca alternifolia* against the dermatophyte *Trichophyton rubrum*. *Foot.* 2004;14:86–91.
21. Inouye S, Nishiyama Y, Hasumi KUY, Yamaguchi H, Abe S. The vapor activity of oregano, perilla, tea tree, lavender, clove, and geranium oils against a *Trichophyton mentagrophytes* in a closed box. *J Infect Chemother.* 2006;12:349–54.
22. Flores FC, de Lima JA, Ribeiro RF, Alves SH, Rolim CMB, Beck RCR, da Silva CB. Antifungal activity of nanocapsule suspensions containing tea tree oil on the growth of *Trichophyton rubrum*. *Mycopathologia.* 2013;175:281–6.
23. Henri I, Bassolé N, Juliani R. Essential oils in combination and their antimicrobial properties molecules. 2012;17:3989–4006.
24. Gonçalves MJ, Cruz MT, Cavaleiro C, Lopes MC, Salgueiro L. Chemical, antifungal and cytotoxic evaluation of the essential oil of *Thymus zygis* subsp. *silvestris*. *Ind Crop Prod.* 2010;32:70–5.
25. Gallucci MN, Carezzano ME, Oliva MM, Demo MS, Pizzolitto RP, Zunino MP, Zygadlo JA, Dambolena JS. In vitro activity of natural phenolic compounds against fluconazole-resistant *Candida* species: a quantitative structure—activity relationship analysis. *J Appl Microbiol.* 2014;116:795–804.
26. Olaizola C, Pérez C, Mata-Essayag S, Hartung C, Collela MT, Magaldi S, Rosell A. Experience with thymol in chloroform solution for the treatment of paronychia. *Mycopathologia.* 2005;159:209–11.
27. Lesage-Meessen L, Bou M, Sigoillot JC, Faulds CB, Lomascolo A. Essential oils and distilled straws of lavender and lavandin: a review of current use and potential application in white biotechnology. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2015;99:3375–85.
28. Shin S, Lim S. Antifungal effects of herbal essential oils alone and in combination with ketoconazole against *Trichophyton* spp. *J Appl Microbiol.* 2004;97:1289–96.
29. Zuzarte M, Gonçalves MJ, Crus MT, Cavaleiro C, Canhoto J, Vaz S, Pinto E, Salgueiro L. *Lavandula luisieri* essential oil as a source of antifungal drugs. *Food Chem.* 2012;135:1505–10.
30. Marzoug HNB, Bouajila J, Ennajar M, Lebrihi A, Mathieu F, Couderc F, Abderraba M, Romdhane M. *Eucalyptus (gracilis, oleosa, salubris, and salmonophloia)* essential oils: their chemical composition and antioxidant and antimicrobial activities. *J Med Food.* 2010;13(4):1005–12.
31. Gupta A, Sharma S, Naik SN. Biopesticidal value of selected essential oils against pathogenic fungus, termites and nematodes. *I Biodeterior Biodegrad.* 2011;65:703–7.
32. Elaissi A, Rouis Z, Salem NAB, Mabrouk S, Salem Y, Salah KBH, Aouni M, Farhat F, Chemli R, Harzallah-Skhirri F, Khouja ML. Chemical composition of 8 eucalyptus species' essential oils and the evaluation of their antibacterial, antifungal and antiviral activities. *BMC Complement Altern Med.* 2012;12:81.
33. Ramsewak RS, Nair MG, Stommel M, Selanders L. In vitro antagonistic activity of monoterpenes and their mixtures against 'toe nail fungus' pathogens. *Phytother Res.* 2003;17:376–9.
34. Derby SR, Rohal P, Jackson C, Beutler A, Olsen C. Novel treatment of onychomycosis using over-the-counter mentholated ointment: a clinical case. *J Am Board Fam Med.* 2011;24:69–74.

35. Palmeira-de-Oliveira A, Salgueiro L, Palmeira-de-Oliveira R, Martinez-de-Oliveira J, Pina-Vaz C, Queiroz JA, Rodrigues AG. Anti-candida activity of essential oils. *Mini Rev Med Chem.* 2009;9:1292–305.
36. Sahin F, Güllüce M, Daferera D, Sökmen A, Polissiou M, Agar G, Hözer H. Biological activities of the essential oils and the methanol extract of *Origanum vulgare* ssp. *vulgare* in the Eastern Anatolia region of Turkey. *Food Control.* 2004;15:549–57.
37. Vale-Silva L, Silva MJ, Oliveira D, Gonçalves MJ, Cavaleiro C, Salgueiro L, Pinto E. Correlation of the chemical composition of essential oils from *Origanum vulgare* subsp. *virens* with their in vitro activity against pathogenic yeasts and filamentous fungi. *J Med Microbiol.* 2012;61:252–60.
38. Pinto E, Salgueiro LR, Cavaleiro C, Palmeira A, Gonçalves MJ. In vitro susceptibility of some species of yeasts and filamentous fungi to essential oils of *Salvia officinallis*. *Ind Crop Prod.* 2007;26:135–41.
39. Ibrahim SY, El-Salam MMA. Anti-dermatophyte efficacy and environmental safety of some essential oils commercial and in vitro extracted pure and combined against four keratinophilic pathogenic fungi. *Environ Health Prev Med.* 2015; 20(4):279–286.
40. Miron D, Cornelio R, Troleis J, Mariath J, Zimmer AR, Mayorga P, Schapoval EES. Influence of penetration enhancers and molecular weight in antifungals permeation through bovine hoof membranes and prediction of efficacy in human nails. *Eur J Pharm Sci.* 2014;51:20–5.
41. Albert SF, Weis ZH. Management of onychomycosis with topicals. *Clin Podiatr Med Surg.* 2004;21:605–15.

**CAPÍTULO 4: Avaliação *in vitro* de formulações contendo nanocápsulas poliméricas como sistemas de liberação ungueal de tioconazol**

---



## **CAPÍTULO 4: Avaliação *in vitro* de formulações contendo nanocápsulas poliméricas como sistemas de liberação ungueal de tioconazol**

### **4.1 Introdução**

Levando em consideração a potencialidade de infecção por fungos dermatófitos em locais distintos, torna-se necessário o desenvolvimento de formulações com características físico-químicas adequadas a cada local. Especialmente para as onicomicoses, os esmaltes apresentam uma opção apropriada, uma vez que estes formam um filme resistente, se comparados às demais formas farmacêuticas, como cremes, soluções e géis (MONTI et al., 2005). No entanto, tais preparações contêm resinas e solventes orgânicos, fato que, em se tratando de locais injuriados e sensíveis, impossibilita sua aplicação em paroníqueas (MONTI et al., 2010).

Assim, o presente Capítulo compreende o desenvolvimento de sistemas nanoestruturados poliméricos contendo como núcleo oleoso triglicerídeos de cadeia média e o antifúngico tioconazol e seu emprego no desenvolvimento de uma formulação ungueal. As formulações foram caracterizadas e avaliadas em relação a liberação ungueal *in vitro*.

A etapa de avaliação da liberação ungueal do tioconazol a partir das formulações desenvolvidas e a caracterização microscópica das mesmas foi realizada durante o estágio doutoral sanduíche na Universidade de Bath (Bath, Inglaterra), sob supervisão da Prof<sup>a</sup> Dra. Maria Begoña Delgado-Charro.

## Abstract

Tioconazole-loaded polymeric nanocapsules, coated and uncoated with a cationic polymer were developed to improve topical drug delivery on the nail. The colloidal systems presented nanometric size around 155 nm for the uncoated nanoparticles and 162 nm for the coated one, with negative and positive zeta potential values, respectively. Both nanosuspensions showed drug content close to theoretical ( $1 \text{ mg mL}^{-1}$ ) (HPLC) and were able to control tioconazole release. The developed formulations showed *in vitro* antifungal activity (agar diffusion method). The coated formulations showed higher viscosity and were elected to be incorporated into an unguinal formulation, which showed adequate physico-chemical properties. The original nanosuspensions and the nail formulation were able to release tioconazole into nail plate. Daily application of the formulations delivered more tioconazole to the nail plate than a single dose. Parating mechanically the nails did not enhance drug delivery. Complementary confocal microscopy experiments estimated the depth of nail penetration for a fluorescent marker incorporated into the formulations of around  $100 \text{ }\mu\text{m}$ . The new nanosized formulations and nail formulation showed lower potential irritant than commercial formulation and the free drug. The new nail formulation is a promising formulation for the treatment of onychomycosis.

**Key words:** Tioconazole; polymeric nanocapsules; cationic coating; nail delivery; onychomycosis.

## 1 INTRODUÇÃO

Onicomicoses são infecções de unhas causadas por fungos, sendo responsáveis por cerca de 50 % das doenças de unhas e as mais relevantes infecções fúngicas superficiais (BARAN; KAOUKHOV, 2005). Estas infecções apresentam elevado índice de refratoriedade ao tratamento devido ao longo período de terapia sistêmica requerida (acima de 12 meses), o que vem acompanhada de interações medicamentosas e efeitos adversos. Adicionalmente, é comum o desenvolvimento de resistência microbiana à terapia sistêmica e a falta de uma terapia tópica eficaz (SHAR, 2007).

O tratamento tópico para onicomicoses é uma alternativa atraente devido a menores incidências de efeitos adversos e interações medicamentosas (MURDAN, 2008). Entretanto, seu uso é limitado pela baixa acessibilidade dos agentes antifúngicos ao tecido infectado devido a baixa permeabilidade através da placa ungueal (MURDAN, 2002; MURDAN, 2008; YANG; WIEDERHOLD, 2008; MURTHY; MAIBACH, 2013), o que implica na dificuldade do estabelecimento e da manutenção dos níveis terapêuticos (KAUR; KAKKAR, 2010; MURTHY; MAIBACH, 2013). A penetração da substância ativa através da unha é crucial, uma vez que os fungos permanecem entrelaçados entre as fibras de queratina ou entre o leito e a placa da unha (BARAN; KAOUKHOV, 2005).

O tioconazol é um antifúngico imidazólico de amplo espectro indicado para o tratamento tópico de onicomicoses como solução a 28% (283 mg/mL) (FROMTLING, 1988; CRYER; ROBINSON, 1997; BARAN; KAOUKHOV, 2005; MURTHY; MAIBACH, 2013). O direcionamento do tioconazol exclusivamente para as unhas e a promoção de uma liberação controlada é um importante fator, uma vez que seu efeito fungicida é dependente da concentração do fármaco no tecido infectado (BEGGS, 1984), enquanto que altas concentrações de tioconazol foram relacionadas a efeitos adversos como dermatites de contato (STUBB et al., 1992).

As formulações de uso tópico mais comuns para o tratamento de desordens ungueais são esmaltes de unha, preparados essencialmente com solventes orgânicos que evaporam rapidamente após aplicação, resultando na formação de cristais de fármaco, incapazes de particionar e difundir através da placa da unha (GUPTA; TU, 2006). Além disso, as formulações tópicos convencionais, como soluções e cremes, são facilmente removidas durante as atividades cotidianas (BARAN; KAOUKHOV, 2005). Assim, se faz necessário que a forma farmacêutica permita que o composto ativo permaneça o tempo requerido na

superfície ungueal sendo hábil em penetrar e encontrar os elementos fúngicos (REPKA; MIDIDODDI; STODGHILL, 2004; YANG; WIEDERHOLD; WILLIAMS, 2008).

Avanços tecnológicos acerca do direcionamento de fármacos tem levado ao encontro da nanotecnologia. Formulações com tamanho de partícula reduzido ( $<1 \mu\text{m}$ ), proporcionando vantagens terapêuticas e tecnológicas vêm sendo extensamente estudadas especialmente no que tange a liberação tópica (BECK; GUTERRES; POHLMANN, 2011). Estes carreadores nanométricos proporcionam uma melhora nas propriedades físico-químicas de fármacos; maior e melhor distribuição da substância ativa no local de ação, além de direcioná-la ao seu sítio específico. Ainda, as nanoestruturas agem como reservatórios de onde o fármaco pode ser liberado lentamente para a pele, garantindo liberação contínua em concentrações eficazes por períodos de tempo prolongados (GUTERRES; ALVES; POHLMANN, 2007; MÜLLER et al., 2007), constituindo, assim, plataformas promissoras para a liberação de substâncias na/atraves da unha.

Este trabalho objetivou a investigação da performance de formulações ungueais contendo tioconazol associado à nanocápsulas poliméricas revestidas com quitosana, como sistemas de entrega ungueais. Adicionalmente, suspensões de nanocápsulas revestidas e não revestidas e uma formulação comercial de tioconazol foram avaliadas.

## 2 PARTE EXPERIMENTAL

### 2.1 MATERIAIS

O tioconazol foi adquirido na Pharma Nostra (São Paulo, Brasil). O polímero poli( $\epsilon$ -caprolactona) (PCL,  $M_w = 70,000-90,000$ ) e quitosana foram adquiridos da Sigma-Aldrich (São Paulo, Brasil) e vermelho do nilo (NR, grau analítico) da Sigma-Aldrich (Gillingham, UK). Lipoid<sup>®</sup> S75 (lecitina de soja) foi adquirido da Lipid Ingredients & Technologies (São Paulo, Brasil). Polissorbato 80, triglicerídeos de cadeia média (TCM) e álcool cetosteárico da Delaware (Porto Alegre, Brasil); imidazolinidil uréia da Fragon (São Paulo, Brasil) e hidroxietilcelulose da Deg (São Paulo, Brasil). Pullulan foi gentilmente doado pela Dinaco (Rio de Janeiro, Brasil). Trosid<sup>®</sup> (Pfizer, Madrid, Espanha) foi obtido comercialmente. As cepas de *C. albicans* ATCC 14057 e de *T. rubrum* (isolado clínico) foram gentilmente doadas pelo Professor Sydney Alves do Laboratório de Pesquisas Micológicas (LAPEMI) da Universidade Federal de Santa Maria (Brasil). Todos os outros reagentes possuíam grau analítico ou farmacêutico.

## 2.2 AMOSTRAS DE UNHA

Fragmentos de unha humana com cerca de oito mm de comprimento foram obtidos de doadores saudáveis após consentimento informado e aprovação pelo Comitê de Ética [Research Ethics Approval Committee for Health (REACH; EP 11/12 115)] da Universidade de Bath. Após coletadas, as amostras de unhas foram limpas com água deionizada, secas com papel absorvente e congeladas (-20 °C) até o momento do experimento. Anteriormente à utilização nos ensaios de permeação, os fragmentos de unha foram imersos em água deionizada por 30 min. Para os ensaios microbiológicos foram utilizados fragmentos de unha das mãos de voluntárias saudáveis, os quais foram previamente esterilizados em autoclave. Da mesma forma, o projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da UFSM (parecer nº 901.451/2014).

## 2.3 PREPARAÇÃO DAS SUSPENSÕES AQUOSAS DE NANOCÁPSULAS POLIMÉRICAS E FORMULAÇÃO UNGUEAL

As suspensões aquosas contendo 1,0 mg/mL de tioconazol associado à nanocápsulas poliméricas, revestidas e não revestidas com o polímero catiônico (TIO-R-NC e TIO-NC, respectivamente), foram preparadas (n=3) por deposição interfacial do polímero pré-formado (FESSI et al., 1989). Resumidamente, uma fase orgânica contendo 0,1 g de polímero (PCL), 0,01 g de tioconazol, 0,33 mL de TCM e 25 mL de acetona, após completa solubilização dos componentes (40 °C, por 1 h sob agitação magnética) foi acrescida de 5 mL de uma solução etanólica de Lipoid<sup>®</sup> S75 (6 mg/mL), e então esta fase foi injetada em 50 mL de uma fase aquosa contendo 0,0768 g de polissorbat 80. A suspensão foi levada ao evaporador rotatório para eliminação do solvente e ajuste da concentração de tioconazol, obtendo-se um volume final de 10 mL. Para as formulações revestidas (TIO-R-NC), o volume final foi ajustado a 9 mL e, então, 1 mL de uma solução aquosa ácida de quitosana (quitosana a 1%, solubilizada em solução de ácido acético glacial a 0,5%) foi lentamente adicionada, gota-a-gota na suspensão original (TIO-NC) e mantida sob agitação, por 1 h. Adicionalmente, foram preparadas formulações sem o fármaco (NC e R-NC) (n=3).

Para a preparação das formulações ungueais (concentração de tioconazol de 1,0 mg/mL), 1% de álcool cetosteárico foi solubilizado em etanol (20 %) e posteriormente acrescentado a 9 mL de TIO-R-NC ou TIO-S, sob agitação. Após, 2 % de pullulan foi adicionado. As formulações foram denominadas L-TIO-R-NC (formulação ungueal contendo

tioconazol associado às nanocápsulas poliméricas revestidas com quitosana) e L-TIO (formulação ungueal contendo tioconazol em solução hidroetanólica a 20%). Formulações controle (sem TIO) foram também preparadas (L-R-NC e L), em triplicata.

## 2.4 CARACTERIZAÇÃO DAS FORMULAÇÕES

Após preparação, as suspensões de nanocápsulas foram caracterizadas e seus parâmetros físico-químicos como teor de fármaco, diâmetro médio de partícula, índice de polidispersão, potencial zeta e pH foram monitorados durante 30 dias.

### 2.4.1 Análise morfológica

A morfologia das nanocápsulas foi verificada utilizando microscopia eletrônica de transmissão (MET) (JEOL JEM-2000, JEOL Ltd., Tokyo, Japão). As suspensões de nanocápsulas (TIO-NC e TIO-R-NC) foram diluídas em água (1:2) e então colocadas em um *grid* de cobre revestido com carbono. Para contraste, foi utilizada uma coloração negativa de acetato de uranila a 2% (p/v).

### 2.4.2 Avaliação do diâmetro médio de partícula e potencial zeta

A determinação do diâmetro médio de partícula e a avaliação do índice de polidispersão (PDI) das suspensões de nanocápsulas (TIO-NC e TIO-R-NC) foram avaliados após diluição (500x) de cada formulação em água purificada e analisadas por espectroscopia de correlação de fótons (PCS; ZetasizerNano ZS, Malvern Instruments, UK), em triplicata.

A medida da mobilidade eletroforética das partículas foi conduzida, em triplicata, a fim de determinar o potencial zeta das suspensões coloidais (ZetasizerNano ZS, Malvern Instruments, UK). Para esta determinação, as amostras foram diluídas (500x) em uma solução de cloreto de sódio 10 mM.

### 2.4.3 Teor de tioconazol e eficiência de encapsulamento

Para as análises de teor de tioconazol, uma alíquota (100 µL) de cada suspensão de nanocápsulas (TIO-NC e TIO-R-NC) foi diluída em 10 mL de metanol, seguida de ultrassonicação por 30 min. As amostras foram filtradas (0,45 µm) e 20 µL de cada amostra

foi analisada por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), conforme metodologia analítica previamente validada (HÄRTER et al., 2014). A fase móvel utilizada foi uma solução de metanol:água (80:20, v/v) com pH da água ajustado para 11, sob um fluxo de 1,0 mL/min. O comprimento de onda utilizado foi 219 nm e a coluna cromatográfica uma Gemini C18 (150 x 4,6 mm, 45 µm, Phenomenex, USA). Para análise do teor de tioconazol nas formulações ungueais, 0,1 g das mesmas foi pesado e diluído em 10 mL de metanol, seguido de ultrassonicação por 30 min. O restante procedeu-se da mesma forma do que para as suspensões coloidais. Para as análises de eficiência de encapsulamento, 300 µL de cada suspensão de nanocápsulas foi submetida à ultrafiltração-centrifugação (Ultrafree-MC 10 000 MW, Merck Millipore, Germany) a 2000xG por 7 min a 25 °C. O ultra-filtrado foi então analisado por CLAE sob as mesmas condições descritas.

#### **2.4.4 Análises de pH**

Os valores de pH foram verificados diretamente nas suspensões coloidais com auxílio de um potenciômetro previamente calibrado (Seven Easy, Mettler Toledo, Brasil). Para as formulações ungueais, as mesmas foram previamente dispersas em água deionizada (10%, p/v), de acordo com a Farmacopéia Brasileira V (2010). As análises foram realizadas em triplicata.

#### **2.4.5 Avaliação da viscosidade das suspensões coloidais**

Para a avaliação da viscosidade das suspensões coloidais, 12 mL de cada amostra foi inserida em um aparato para viscosidade ultra-baixa e analisada com auxílio de spindle ULA. Os mensuramentos foram realizados a 25 °C em viscosímetro rotacional (Brookfield LVDVII+ PRO Digital Viscosimeter, Brookfield Instruments, UK). Para cada amostra, 10 pontos foram recordados, iniciando com uma velocidade de 60 RPM, sofrendo acréscimos de 2,5 RPM a cada minuto.

#### **2.4.6 Determinação da distribuição de fármaco nos sistemas coloidais**

Sabe-se que a diluição de formulações pode modificar o equilíbrio de distribuição do fármaco, e uma quantificação imediata dos ultra-filtrados poderia gerar informações sobre a distribuição de fármacos nas partículas, podendo este estar localizado na pseudo-fase externa

(moléculas hidrofílicas), na interface e/ou na pseudo-fase interna (moléculas lipofílicas). A fim de determinar o tipo de distribuição e a localização do tioconazol na partícula, o algoritmo proposto por Oliveira e colaboradores (2013) foi seguido. Após subseqüentes diluições em água (1:1, 1:9, 1:99 and 1:999, v/v) das suspensões de nanocápsulas (TIO-NC e TIO-R-NC), 300 µL de cada amostra diluída foi submetida a ultrafiltração-centrifugação (Ultrafree-MC 10000 MW, Merck Millipore, Germany) a 2000xG por 5 minutos. A quantidade de tioconazol em cada ultra-filtrado foi verificado por CLAE, sob a mesma metodologia descrita anteriormente (HÄRTER et al., 2014). A partir dos resultados, seguindo o algoritmo proposto, o mecanismo de distribuição do fármaco foi elucidado.

## 2.5 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIFÚNGICA *IN VITRO* DAS SUSPENSÕES DE NANOCÁPSULAS

A atividade antifúngica *in vitro* das suspensões de nanocápsulas foi investigada frente à *C. albicans* (ATCC 14057) por difusão em ágar, com o intuito de verificar se o processo de obtenção das suspensões afetaria a eficácia antifúngica do tioconazol. Para o experimento, um repique do micro-organismo em ágar Sabouraud Dextrose (ASD, Merck) foi mantido em estufa a 25 °C, por 48 h. Uma suspensão da levedura, preparada em solução de NaCl 0,9 %, contendo cerca de  $1,6 \times 10^7$  UFC/mL (25 % de transmitância) foi adicionada, na concentração de 1 % ao ASD. O ágar contendo o inóculo (5 mL) foi adicionado a placas de Petri contendo 20 mL de ASD solidificado. Poços de 9 mm de diâmetro foram feitos com auxílio de furador estéril. 100 µL de cada amostra (TIO-R-NC e TIO-NC), controle positivo (solução de tioconazol - TIO-S), formulações sem o fármaco (R-NC e NC) e a água para realizar as diluições das formulações foram adicionados de modo a preencher cada poço. A concentração de tioconazol em cada amostra empregada foi de 1 µg/mL. As placas foram incubadas em estufa com temperatura controlada de 37 °C, por 24 h e, após, o halo de inibição foi mensurado com auxílio de paquímetro digital (Mitutoyo, Brasil). O experimento foi conduzido em sextuplicata.

## 2.6 CARACTERIZAÇÃO DAS FORMULAÇÕES UNGUEAIS

As formulações ungueais (L-TIO-R-NC) foram caracterizadas quanto ao teor de tioconazol e pH, conforme descritos dos itens 2.4.3 e 2.4.4, respectivamente. As formulações

foram ainda avaliadas quanto à presença das nanocápsulas, índice de polidispersão e viscosidade conforme descrito a seguir.

A presença das nanocápsulas após a incorporação nas formulações ungueais foi avaliada, em triplicata, após redispersão das formulações em água ultra-pura (500x) por 3 h. As amostras foram filtradas (Quanty JP41, 80 g m<sup>-2</sup>; 28 µm, J Prolab, Brasil) e analisadas por espectroscopia de correlação de fótons (ZetasizerNano ZS, Malvern Instruments, UK) para a obtenção do diâmetro médio de partículas e do índice de polidispersão.

A determinação da viscosidade das formulações foi realizada em viscosímetro rotacional (Brookfield LVDVII +ProModel, USA). As amostras foram inseridas (7,5 mL) em um adaptador para pequenas amostras e a leitura foi realizada utilizando um *spindle* SC4-18, a uma velocidade de 20 RPM, a 25 °C, por 60 s (n=3).

## 2.7 AVALIAÇÃO MORFOLÓGICA DAS FORMULAÇÕES APÓS APLICAÇÃO NAS UNHAS

Objetivando observar a estrutura das formulações finais, análises por microscopia eletrônica de varredura (MEV, JEOL SEM6480LV, JEOL Ltd., Tokyo, Japão) foram conduzidas. As formulações L-TIO-R-NC e L-TIO foram aplicadas com auxílio de palinetes de algodão na superfície dorsal da unha. Após a secagem das formulações, as unhas foram afixadas em *stubs* de alumínio com auxílio de uma fita dupla-face e então metalizadas com ouro.

## 2.8 ESTUDO DE LIBERAÇÃO/DIFUSÃO DO TIOCONAZOL A PARTIR DAS FORMULAÇÕES DESENVOLVIDAS

A fim de avaliar o perfil de liberação do tioconazol a partir das nanocápsulas poliméricas, estudos de liberação utilizando sacos de diálise foram realizados por um período de 72 h (MWCO = 12,000 to 14,000 Da, Sigma-Aldrich Corporation, USA). Para avaliar a habilidade das formulações em manter o tioconazol solúvel e permitir sua difusão através de uma membrana hidrofóbica, durante longos períodos de tempo, estudos foram conduzidos utilizando uma membrana de silicone (75 µm de espessura, Dow-Conming, Coventry, UK). A membrana de silicone foi posicionada entre os compartimentos doador e receptor de células de difusão do tipo Franz, com área de difusão de 3,14 cm<sup>2</sup> (PermeGear Inc., Bethlehem, PA, USA). Assim, 1,0 mL de cada formulação (TIO-NC, TIO-R-NC e TIO-S) foi aplicado no

compartimento doador, posteriormente coberto com Parafilm<sup>®</sup>. O compartimento receptor foi preenchido cuidadosamente com o meio de liberação (cerca de 10 mL) evitando a formação de bolhas. O aparato foi incubado a 32 °C, sob moderada e contínua agitação. Em períodos de tempo pré-determinados (1, 2, 4, 6, 8, 10, 24, 34, 48, 58 e 72 h), 0,5 mL de meio receptor foi coletado e o tioconazol quantificado por CLAE (Jasco, CA, USA). Para os ensaios utilizando os sacos de diálise, 1,5 mL de cada formulação (TIO-NC, TIO-R-NC e TIO-S) foi inserido no interior do saco e este imerso em 150 mL de meio e incubado em banho termostarizado a 32 °C, sob agitação moderada e constante. Em tempos pré-estabelecidos, 1,0 mL do meio de liberação foi coletado. As amostras foram analisadas por CLAE (Agilent, 1260, USA), utilizando metodologia previamente validada em ambos os testes (HÄRTER et al., 2014). Em ambos, o meio de liberação utilizado foi tampão fosfato pH 7,4 com 0,5% de polissorbato 80 (atendendo as condições de não saturação do meio) e a mesma quantidade de meio coletado foi repostado por meio fresco. Os resultados obtidos foram comparados aos verificados para a difusão do fármaco a partir de uma solução hidroetanólica (50:50, v/v) de tioconazol (TIO-S), e analisados de acordo com diferentes modelos matemáticos (MicroMath<sup>®</sup> Scientist<sup>®</sup> for Windows<sup>™</sup>) de ordem zero ( $C = k_0 t$ ), primeira ordem (mono-exponencial,  $C = C_0 e^{-kt}$  e bi-exponencial,  $C = a e^{-k_1 t} + b e^{-k_2 t}$ ) e Korsmeyer-Peppas ( $C_t = a t^n$ ). Onde  $C$  é a quantidade de fármaco liberada no tempo  $t$ ,  $k$  é a velocidade de dissolução,  $a$  e  $b$  são as concentrações de fármaco e  $n$  é o expoente de liberação (COSTA; LOBO, 2001). A escolha do modelo mais apropriado foi realizada com base no coeficiente de correlação ( $r$ ), no critério de seleção do modelo (MSC) e no ajuste gráfico.

Da mesma forma, o experimento utilizando membrana de silicone foi conduzido para avaliar a transposição do tioconazol através de uma barreira hidrofóbica a partir da formulação ungueal associado às nanoestruturas (L-TIO-R-NC), da formulação ungueal contendo o fármaco não associado (L-TIO) e da formulação comercial Trosid<sup>®</sup>. Adicionalmente, as formulações unguais foram avaliadas de acordo com o modelo de Higuchi ( $C = K_H t^{1/2}$ ).

## 2.9 ESTUDOS DE PERMEAÇÃO/PENETRAÇÃO UNGUEAL *IN VITRO*

Objetivando investigar a permeação/penetração ungueal *in vitro* do tioconazol a partir das formulações desenvolvidas, diferentes protocolos foram conduzidos, utilizando distintos aparatos, seguindo aplicação única e diária das formulações. Por último, a microporação na superfície dorsal da unha como pré-tratamento foi investigada.

## 2.9.1 Aplicação única

### 2.9.1.1 Células de difusão tipo Franz

Primeiramente, o estudo de permeação ungueal foi conduzido utilizando fragmentos de unhas humanas colocados entre dois adaptadores (PermeGear Inc., Bethlehem, PA, USA, área de difusão = 0,2 cm<sup>2</sup>), com a superfície ventral voltada para o compartimento receptor e então prensados entre os compartimentos doador e receptor de células de difusão verticais tipo Franz (NOGUEIRAS-NETO et al., 2013). O compartimento receptor foi cuidadosamente preenchido com cerca de 7,5 mL de meio de liberação (tampão fosfato pH 7,4 + 0,5% polissorbato 80) e 0,5 mL de cada formulação líquida (TIO-NC, TIO-R-NC e TIO-S) foi aplicada na superfície dorsal da unha, em triplicata. O compartimento doador foi coberto com Parafilm<sup>®</sup> para evitar a evaporação. Amostras foram coletadas (0,6 mL) diariamente, durante sete dias, e analisadas por CLAE (Jasco, CA, USA). O mesmo volume de meio fresco foi repostado.

### 2.9.1.2 Células in line

Objetivando maximizar a quantificação analítica do tioconazol no meio receptor, uma segunda bateria de experimentos foi realizada substituindo as células de difusão tipo Franz por um adaptador com pequeno volume de receptor (cerca de 0,5 mL), as células *in line* (PermeGear Inc., Bethlehem, PA, USA). Neste protocolo, 0,3 mL de cada suspensão coloidal (TIO-NC, TIO-R-NC) e o fármaco em solução (TIO-S) foi aplicado e o compartimento doador fechado. Os aparatos foram incubados a 32 °C sob agitação durante sete dias. Amostras (0,4 mL) foram coletadas diariamente e analisadas por CLAE (Jasco, CA, USA). A mesma quantidade de meio retirada foi repostada com meio fresco.

Para avaliação das formulações ungueais (L-TIO-R-NC e L-TIO) um compartimento doador aberto substituiu o compartimento fechado.

## 2.9.2 Aplicação diária

Este protocolo foi conduzido utilizando as células *in line* sob as mesmas condições descritas no item 2.8.1.2, porém, aplicando as formulações diariamente, uma vez ao dia, durante sete dias. Antes de cada reaplicação, as formulações foram cuidadosamente removidas com água e palinetes de algodão (três lavagens). Neste protocolo, a formulação comercial ungueal de tioconazol, Trosid<sup>®</sup>, contendo 28% de tioconazol, foi também avaliada.

Adicionalmente, a fim de seguir a posologia do Trosid<sup>®</sup>, a formulação comercial foi aplicada com auxílio de um pincel (cerca de 0,003 g de formulação, contendo, aproximadamente, 0,85 mg de tioconazol), duas vezes ao dia.

### 2.9.3 Microporação nas unhas

Objetivando investigar se a microporação como pré-tratamento exerceria algum efeito na permeação ungueal, microporos foram feitos na superfície dorsal da unha, com auxílio de microagulhas de titânio de 250 µm de comprimento (Infinitive beauty<sup>®</sup>, Birmingham, UK). As formulações foram aplicadas uma única vez e diariamente, durante sete dias. As amostras foram coletadas a cada 24 h para posterior análise por CLAE (Jasco, CA, USA).

### 2.9.4 Avaliação da quantidade de tioconazol retido na placa ungueal

Para todos os protocolos, ao final dos sete dias, os fragmentos de unha foram removidos do adaptador, o excesso de formulação foi cuidadosamente retirado, e as unhas lavadas com água deionizada. A quantidade total de tioconazol retida na unha foi quantificada por CLAE (Jasco, CA, USA). Para tal, a área de difusão da unha, a qual foi exposta às formulações, foi cuidadosamente cortada em pequenos fragmentos, e estes colocados em imersão em uma solução metanol:água (80:20, v/v), sob agitação por sete dias, a fim de promover a extração do fármaco a partir da placa ungueal.

Para estabelecer uma melhor comparação entre formulações desenvolvidas com a formulação comercial Trosid<sup>®</sup> e levando em consideração a quantidade total de fármaco aplicada em sete dias ( $TIOA_7$ ) e o total de fármaco quantificado na unha (TIO), o percentual de fármaco recuperado (TIOR%) foi calculado de acordo com a Equação 1.

$$TIOR\% = \frac{TIO}{TIOA_7} \times 100 \quad (1)$$

## 2.10 MICROSCOPIA CONFOCAL DE VARREDURA A LASER (MCVL)

A fim de estimar a profundidade de penetração na unha, um marcador fluorescente (substituindo o tioconazol) foi incorporado nas nanocápsulas revestidas e não revestidas e a

microscopia confocal foi realizada (DUTET; DELGADO-CHARRO, 2012; CHIU et al., 2015).

### **2.10.1 Preparação de nanocápsulas contendo vermelho do Nilo**

As nanocápsulas contendo vermelho do Nilo (NR) (NR-NC e NR-R-NC) foram preparadas, substituindo tioconazol pelo marcador fluorescente, que possui propriedades físico-químicas semelhantes às do fármaco ( $\log P = 5,0$ ; peso molecular, MW = 318,3; pKa = 4,8 para NR;  $\log P = 5,3$ ; MW = 387,7; pKa = 6,5 para tioconazol). As suspensões de nanocápsulas foram preparadas da mesma forma que as contendo tioconazol, de acordo com metodologia descrita no item 2.3. Após a preparação, as formulações foram filtradas em membrana de nylon (0,45  $\mu\text{m}$ , Whatman, Maidstone, UK) para evitar a presença de agregados. A quantidade de NR foi reduzida para garantir sua total associação com as nanopartículas (0,15 mg/mL). Como controle, uma solução do marcador, NR-S (etanol:água 50:50, v/v), na mesma concentração foi também preparada. Além disso, foi preparada e avaliada uma formulação ungueal contendo NR-R-NC (L-NR-R-NC).

A concentração de NR nas nanocápsulas foi avaliada por CLAE (Jasco, CA, USA) com detector fluorescente (Dionex, Sunnyvale, CA, USA) e uma coluna HiQ sil C18W (250 x 4,6 mm) (KYA Tech, Tokyo, Japão). O método utilizado foi previamente validado e a fase móvel, a um fluxo de 1 mL/min utilizada foi metanol:água (95:5, v/v). O volume de injeção foi 20  $\mu\text{L}$ . Para excitação, foi utilizado um comprimento de onda de 559 nm e para emissão de 630 nm.

### **2.10.2 Estudos de liberação do NR a partir das suspensões de nanocápsulas e da formulação ungueal**

Estudos de liberação do marcador fluorescente a partir das suspensões coloidais e da formulação ungueal foram conduzidos para verificar a habilidade das novas nanocápsulas em manter o marcador solúvel e permitir sua difusão durante períodos estendidos de tempo, seguindo a metodologia da secção 2.8, utilizando membrana de silicone como barreira à difusão. Para este experimento, 1 mL de cada formulação (NR-NC, NR-R-NC, NR-S e L-NR-R-NC) foi aplicado no compartimento doador e este coberto com Parafilm<sup>®</sup>. O compartimento receptor foi preenchido cuidadosamente com 7,5 mL do meio de liberação (tampão fosfato pH

7,4 + 0,5% de polissorbato 80). O aparato foi incubado a 32°C sob moderada e contínua agitação.

### 2.10.3 Estudos de permeação ungueal utilizando vermelho do Nilo

Os fragmentos de unha humana (8 mm de comprimento) foram dispostos no adaptador para unhas para células de Franz (PermeGear Inc., Bethlehem, PA, USA). A face dorsal da unha foi voltada para o compartimento doador, onde 0,5 mL de cada amostra contendo NR foi aplicada. Três diferentes protocolos foram seguidos: 1) aplicação única das formulações (NR-R-NC, NR-NC e NR-S); 2) aplicação diária das formulações (L-NR-R-NC, NR-R-NC, NR-NC e NR-S); 3) aplicação diária das formulações (L-NR-R-NC, NR-R-NC, NR-NC e NR-S) em unhas microporadas. Para a aplicação diária, anteriormente a cada reaplicação, o dorso da unha foi cuidadosamente limpo com água deionizada e palinetes de algodão, por três vezes. O aparato foi incubado a 32 °C sob agitação, por sete dias, e então os fragmentos de unha foram cuidadosamente removidos do adaptador e lavados com água deionizada. A parte da unha exposta às formulações foi seccionada em uma peça retangular para imagens dorsais (as imagens foram capturadas em três diferentes regiões por peça) e em três finas fatias para imagens transversais.

#### 2.10.3.1 MCVL imagens

As imagens foram realizadas utilizando microscópio de varredura LSCM 510Meta com laser invertido (HeNe, 543 nm) (Carl Zeiss, Jena, Germany). Para as imagens dorsais da unha, foi utilizada a lente objetiva EC Plan-Neo 40x/1.3 M27, e as imagens foram capturadas a cada 2 µm de profundidade. As unhas seccionadas para as imagens transversais foram dispostas com a secção transversal voltada a poucos microns da objetiva (Plan-Apochomath 10x/0.45 M27). Para as imagens transversais, 10 medições foram realizadas em cada porção transversal de unha. Imagens ópticas e de refletância foram capturadas simultaneamente e processadas com auxílio do software ImageJ (US National Institutes and Health, USA).

## 2.11 AVALIAÇÃO DA EFICÁCIA DAS FORMULAÇÕES EM MODELO *IN VITRO* DE ONICOMICOSE

A formulação ungueal (L-TIO-R-NC), e para fins comparativos, a formulação comercial para unhas (Trosid<sup>®</sup>) foram avaliadas em modelo *in vitro* de onicomicose, segundo

metodologia proposta por Flores e colaboradores (2013) com algumas modificações (n=3). Primeiramente foram preparados blocos de ágar Sabouraud dextrose (ASD, Merck) a partir da inoculação de cerca de  $10^5$  UFC/mL (1%, v/v) de *Trychophyton rubrum* (isolado clínico). A suspensão de *T. rubrum* foi preparada a partir de uma cultura de sete dias do microorganismo cultivada em ágar batata (Difco) a uma temperatura de 25 °C. A parte ventral dos fragmentos de unha foram colocados em contato com os blocos de ágar inoculados de, aproximadamente, 3 mm<sup>2</sup> de área e então dispostos, separadamente, com a parte contendo o ágar voltado para baixo, em uma placa de Petri pequena (5 cm) estéril, de modo que a parte dorsal da unha ficasse exposta. A umidade do ar foi mantida com auxílio de uma placa de Petri maior (9 cm) contendo 4 mL de água estéril, e a manutenção da umidade no bloco de ágar, foi mantida com hidratação diária de 50 µL de caldo sabouraud dextrose (Merck) estéril diretamente no bloco. As formulações contendo tioconazol foram aplicadas diretamente no dorso das unhas de modo a cobrir totalmente o fragmento, uma vez ao dia, durante 15 dias. Como controle foi utilizada solução salina. Ao final de 15 dias, a presença do fungo nas unhas foi verificada visual e microbiologicamente.

## 2.12 AVALIAÇÃO DO POTENCIAL DE IRRITAÇÃO DAS FORMULAÇÕES

A avaliação do potencial de irritação das formulações contendo tioconazol foi realizada seguindo o método de HET-CAM (Hen's Egg Test – Chorioallantoic Membrane) proposto por Lupke (1985). Neste experimento foram utilizados ovos de galinha Cobb 500 (Laboratório de Avicultura, LAVIC, UFSM). Os ovos fecundados foram mantidos em incubadora por 9 dias à temperatura (37,7 °C) e umidade (32,2 %) controladas. No nono dia de incubação os ovos foram retirados da incubadora e a casca, no lado da câmara de ar, foi retirada cuidadosamente com auxílio de pinças. A membrana externa foi umedecida com solução fisiológica estéril e cuidadosamente retirada, com auxílio de uma pinça, expondo a membrana cório-alantóide. 200 µL de cada formulação a ser testada (TIO-R-NC, TIO-NC, L-TIO-R-NC, Trosid®, TIO em solução hidroenânica a 20% e os controles R-NC, NC, L-R-NC e solução etanol:água a 20%) permaneceram em contato com a membrana cório-alantóide por 20 segundos e, após, foram removidas totalmente com solução fisiológica. A quantidade de etanol utilizada para solubilizar o fármaco para a preparação da solução foi de 20%, a mesma concentração de etanol presente na formulação ungueal (L-TIO-R-NC). Em seguida procedeu-se a observação visual dos eventos de vasodilatação, hemorragia e coagulação durante cinco minutos, e o tempo de surgimento de cada evento foi registrado. Como controle

positivo para os eventos foi utilizada solução de lauril sulfato de sódio 1% e como controle negativo solução fisiológica estéril. As análises foram realizadas em sextuplicata. Para a determinação do grau de irritação foi determinado o índice de HET-CAM (HET-CAM) conforme a Equação 2:

$$\text{HET-CAM} = (301 - h) \times 5 / 300 + (301 - v) \times 7 / 300 + (301 - c) \times 9 / 300 \quad (2)$$

Onde h é o tempo (segundos) no qual se observou a presença de hemorragia; v é o tempo (segundos) no qual se observou a presença de vasodilatação; c é o tempo (segundos) no qual se observou a presença de coagulação.

Os valores de HET-CAM obtidos foram avaliados segundo a classificação descrita na Tabela 1:

Tabela 1 – Classificação do potencial de irritação de acordo com o índice de HET-CAM

<b>Índice de HET-CAM</b>	<b>Grau de Irritação</b>
0,0 – 0,9	Não irritante
1,0 – 4,9	Ligeiramente irritante
5,0 – 8,9	Irritante
9,0 – 21	Muito irritante

### 3 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Todos os experimentos foram conduzidos em triplicata (com exceção dos experimentos de avaliação da atividade antifúngica *in vitro*, da avaliação do potencial irritante das formulações, que foram conduzidos em sextuplicata) e os resultados expressos como média ± DP (desvio padrão). Os resultados foram analisados por ANOVA de uma via seguido de Teste de Tukey, a um nível de significância de 5%.

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 PRODUÇÃO DAS NANOCÁPSULA POLIMÉRICAS

Após a preparação, todas as formulações líquidas apresentaram aspecto homogêneo leitoso com um leve reflexo azulado, decorrente do efeito *Tyndall*. A análise morfológica das

suspensões, realizada por microscopia eletrônica de transmissão (MET), demonstrou a forma esférica e homogênea das nanopartículas (Figura 1), com tamanho de partícula que corrobora com o tamanho mensurado por espectroscopia de correlação de fótons (ECF) (Tabela 2).

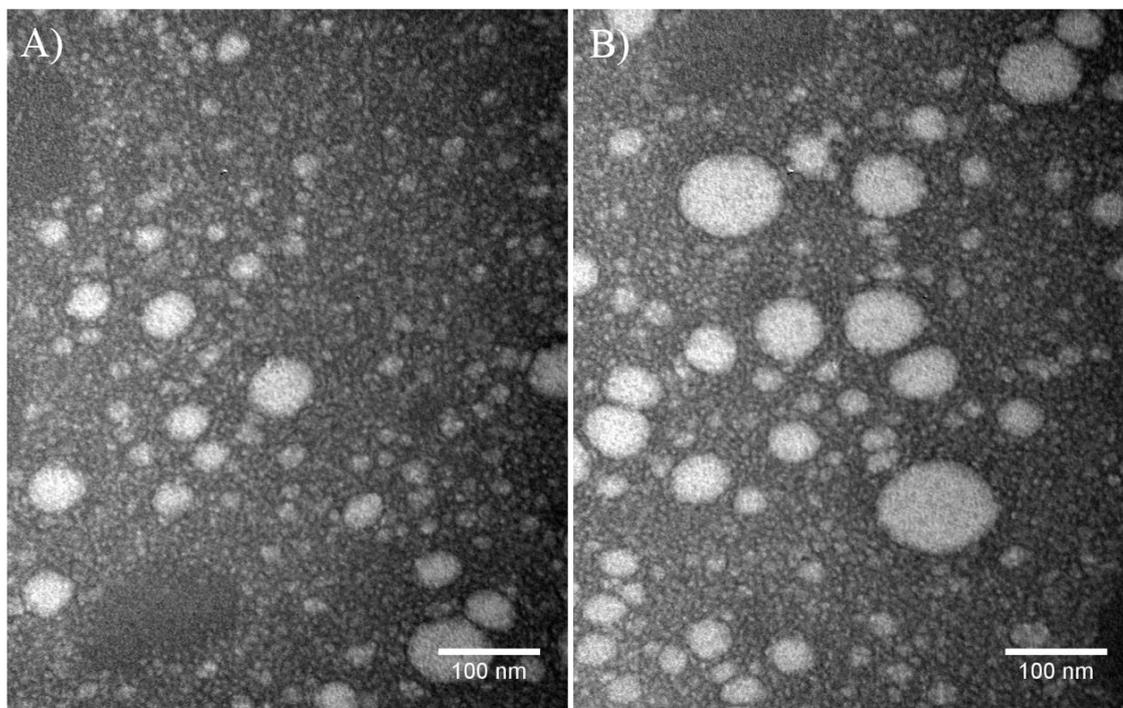


Figura 1. Imagens por MET de A) TIO-NC e B) TIO-R-NC. Ampliação em 150,000 x; barra = 100 nm).

Os parâmetros físico-químicos avaliados encontram-se na Tabela 2. As formulações apresentaram pH levemente ácido, com valores ligeiramente mais ácidos para as formulações revestidas com quitosana, devido à adição da solução ácida do polissacarídeo. O tamanho médio de partícula, determinado por PCS, demonstrou diâmetros na faixa nanométrica, com valores de índice de polidispersão inferiores a 0,15, indicado a homogeneidade do sistema. Embora discretas, foram observadas diferenças significativas no tamanho das nanoestruturas entre TIO-NC e TIO-R-NC ( $p \leq 0,05$ ), provavelmente devido ao revestimento catiônico. Siqueira e colaboradores (2011) atribuíram a diferença entre os diâmetros de partículas de nanocápsulas revestidas e não-revestidas pela camada de quitosana circundante. O potencial zeta apresentou-se negativo para TIO-NC em consequência das matérias-primas utilizadas e positivo para TIO-R-NC devido ao revestimento catiônico proporcionado pela quitosana. O teor de tioconazol foi próximo ao teórico (1,0 mg/ mL) e a eficiência de encapsulamento de cerca de 100% para ambas formulações (Tabela 2).

Tabela 2. Características físico-químicas das formulações TIO-NC e TIO-R-NC (1 mg/mL) (n=3, média  $\pm$  DP).

Formulação	DM (nm)	PZ (mV)	PDI	Teor (mg/mL)	EE (%)	pH
TIO-NC	155 $\pm$ 2 <sup>a</sup>	-8,5 $\pm$ 0,7 <sup>a</sup>	0,11 $\pm$ 0,01 <sup>a</sup>	0,99 $\pm$ 0,01 <sup>a</sup>	99,2	6,06 $\pm$ 0,12 <sup>a</sup>
TIO-R-NC	162 $\pm$ 6 <sup>b</sup>	+16,3 $\pm$ 0,8 <sup>b</sup>	0,15 $\pm$ 0,01 <sup>b</sup>	0,99 $\pm$ 0,01 <sup>a</sup>	99,5	4,23 $\pm$ 0,21 <sup>b</sup>

DM: diâmetro médio; PZ: potencial zeta; PDI: índice de polidispersão; EE: eficiência de encapsulamento. \*Letras diferentes na mesma coluna representam valores estatisticamente diferentes ( $p \leq 0,05$ ).

Após caracterização, as formulações foram armazenadas em frascos de vidro âmbar, protegidas da luz e à temperatura ambiente e os parâmetros reavaliados após 30 dias. Nos primeiros 30 dias, não houve variação nos parâmetros avaliados ( $p > 0,05$ ), com exceção dos valores de pH para TIO-NC, que apresentaram uma ligeira acidificação ( $p \leq 0,05$ ).

A análise reológica das suspensões demonstrou um comportamento Newtoniano de fluxo, com valores de viscosidade de 1,25  $\pm$  0,01 mPas para TIO-NC e 4,62  $\pm$  0,02 mPas para TIO-R-NC. Outros trabalhos reportam valores inferiores a 2 mPas de viscosidade para nanocapsulas poliméricas sem revestimento (RIGO et al., 2014; VENTURINI et al., 2015). Os valores superiores de viscosidade obtidos para as formulações revestidas com quitosana ( $p \leq 0,05$ ) estão relacionados com a presença do revestimento com o polímero catiônico (SIQUEIRA, 2008).

O mecanismo de distribuição de fármaco em uma partícula leva em consideração a sua solubilidade aquosa, ou suas características lipofílicas, podendo seguir 6 tipos de distribuição. O Tipo I caracteriza a distribuição de moléculas solúveis em água (100% do fármaco presente na pseudo-fase externa), enquanto que os Tipos II e III representam partículas em que, parte do fármaco está disperso na água e outra parte no colóide, localizado na superfície (Tipo II) ou com alguma quantidade no núcleo oleoso (Tipo III). No caso de o fármaco não estar totalmente associado à nanopartícula, devido à supersaturação, é caracterizado como Tipo V. Para fármacos lipofílicos, que se encontram totalmente associados às nanopartículas, este pode estar localizado principalmente na interface (Tipo IV) ou principalmente no núcleo oleoso (Tipo VI). Os resultados obtidos experimentalmente demonstram que, sem diluição, após a ultrafiltração-centrifugação, não foi possível quantificar o tioconazol no ultra-filtrado, para ambas formulações. Ao diluir as suspensões coloidais a uma proporção de 1:99, cerca de 2,7% de tioconazol pôde ser quantificado no ultra-filtrado somente para TIO-NC. Ao diluir as suspensões a uma proporção de 1:999 não foi observada a presença de tioconazol no ultra-

filtrado para as formulações. De acordo com o algoritmo proposto por Oliverira e colaboradores (2013), nestas condições, as suspensões de nanocápsulas, tanto TIO-NC como TIO-R-NC puderam ser classificadas como Tipo VI, em que uma pequena quantidade do fármaco, no caso o tioconazol, está localizado na superfície da partícula e a maior parte encontra-se localizada no núcleo de TCM.

#### 4.2 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIFÚNGICA DAS SUSPENSÕES COLOIDAIS

A atividade antifúngica das nanocápsulas revestidas e não-revestidas contendo tioconazol (TIO-R-NC e TIO-NC) foram avaliadas por difusão em ágar em poços frente à *C. albicans* ATCC 14057 (n=6). Para as formulações de TIO-R-NC, os halos de inibição encontrados foram de  $29,99 \pm 2,43$  e para TIO-NC,  $28,03 \pm 1,11$ . Os resultados das medidas dos halos foram comparados aos apresentados para a solução de tioconazol (TIO-S), que demonstraram halos de  $28,94 \pm 1,56$  e não foram observadas diferenças ( $p > 0,05$ ) entre as atividades das suspensões coloidais e do fármaco não associado, demonstrando que o método de preparação, a natureza dos constituintes e o revestimento com solução ácida de quitosana não interferiu na eficácia antifúngica do tioconazol. Não foram evidenciados halos de inibição para as formulações sem o fármaco, tampouco para a água utilizada como diluente.

#### 4.3 CARACTERIZAÇÃO DAS FORMULAÇÕES UNGUEAIS

As nanocápsulas revestidas com quitosana apresentaram características físico-químicas mais adequadas à aplicação ungueal, com maior viscosidade e bioadesividade (conforme visualizado em estudos prévios) e, tendo em vista a superfície de característica negativa das unhas (MURTHY; MAIBACH, 2013), foram eleitas para o desenvolvimento de formulações específicas para aplicação ungueal, as L-TIO-R-NC. As formulações apresentaram aspecto homogêneo e brilhante de coloração branca. O pH das mesmas apresentou-se levemente ácido ( $4,87 \pm 0,02$ ), o teor de fármaco foi próximo ao teórico ( $0,97 \pm 0,02$  mg/mL) e a viscosidade das formulações foi de  $13,63 \pm 1,05$  mPas (20 RPM).

As formulações também foram avaliadas em relação à presença das nanocápsulas após preparação da formulação ungueal. Após dispersão em água, foram observados diâmetros de partículas na faixa nanométrica, de  $236 \pm 10$  nm. Comparando-se os valores de diâmetro de partícula das suspensões poliméricas (TIO-R-NC) antes de serem incorporadas à formulação ungueal, observa-se um ligeiro aumento ( $p \leq 0,05$ ), que pode ser devido à presença do agente

de consistência, podendo vir a dificultar a adequada dispersão das nanoestruturas (SANNA et al., 2010). Soma-se a isso o fato de o polímero formador de filme Pullulan apresentar caráter aniônico e capacidade de bioadesão (CHENG; DEMIRCI; CATCHMARK, 2011), podendo aderir-se à superfície positivamente carregada das nanocápsulas, dificultando ainda mais a sua dispersão.

#### 4.4 AVALIAÇÃO MORFOLÓGICA DA FORMULAÇÃO UNGUEAL APÓS APLICAÇÃO EM UNHAS

A partir das imagens obtidas por microscopia eletrônica de varredura (MEV) das amostras (Figura 2), pode-se observar claramente a presença das nanoestruturas no filme formado, após aplicação ungueal.

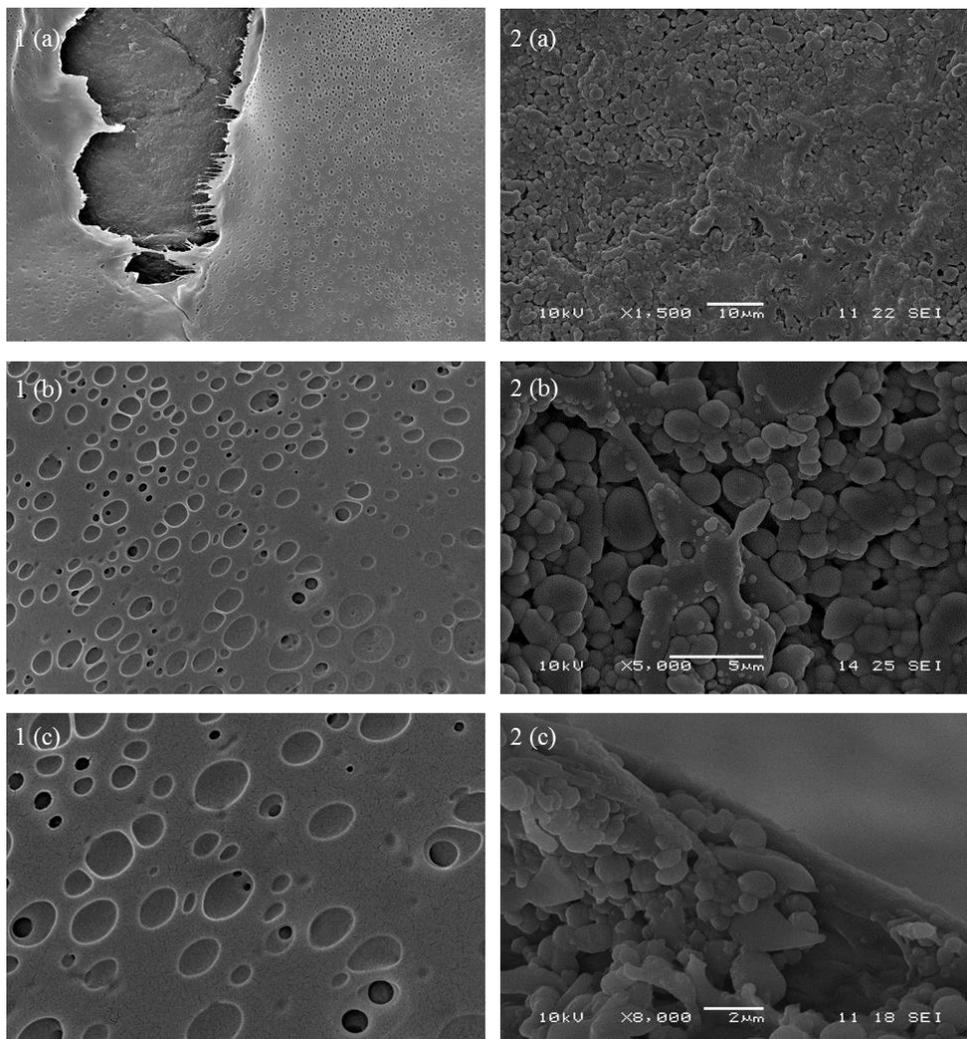


Figura 2. Imagens por MEV da superfície dorsal da unha tratada com: 1) formulação ungueal-base (sem nanocápsulas) e 2) L-TIO-R-NC, em três diferentes ampliações: (a) 1.5K; (b) 5K e (c) 8K.

#### 4.5 ESTUDO DE LIBERAÇÃO DO TIOCONAZOL

Estudo *in vitro* de liberação do tioconazol a partir das nanocápsulas poliméricas foi conduzido utilizando sacos de diálise e o perfil de fármaco liberado foi avaliado durante 72 h. Já a habilidade das suspensões de nanocápsulas em manter o tioconazol solúvel e liberá-lo através de uma barreira hidrofóbica foi verificada utilizando membranas de silicone como barreira à difusão do fármaco.

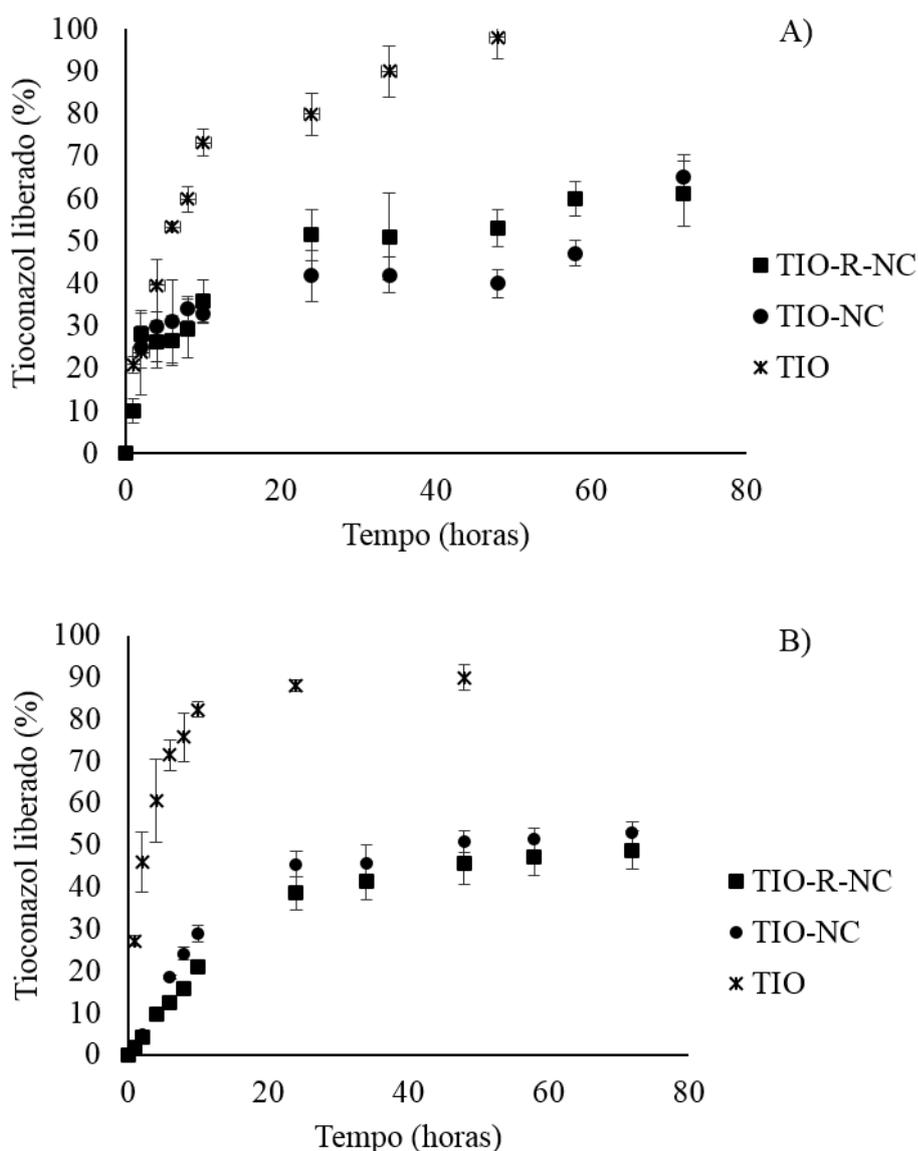


Figura 3. Perfil de liberação do tioconazol a partir das suspensões de nanocápsulas (TIO-NC, TIO-R-NC) e da solução (TIO-S) utilizando A) saco de diálise e B) membrana de silicone, por 72 h (n=3).

A liberação do tioconazol a partir das suspensões de nanocápsulas, revestidas ou não (Figura 3A), e a difusão do fármaco através da membrana de silicone (Figura 3B) demonstrou perfis de liberação similares, independente do tipo de barreira utilizada ( $p > 0,05$ ).

Os resultados dos percentuais de tioconazol liberado a partir das nanoestruturas e a difusão do tioconazol a partir das formulações através da membrana hidrofóbica foram avaliados segundo modelos matemáticos. A liberação do tioconazol a partir das nanocápsulas seguiu um modelo de primeira ordem bi-exponencial, apresentando velocidades de liberação para a fase inicial de  $0,14 \pm 0,01 \text{ h}^{-1}$  e  $0,15 \pm 0,01 \text{ h}^{-1}$  para TIO-NC ( $r = 0,99 \pm 0,01$ ) e TIO-R-NC ( $r = 1,00 \pm 0,01$ ), seguida de uma fase de liberação sustentada que apresentou velocidades de liberação de  $0,005 \pm 0,001 \text{ h}^{-1}$  e  $0,006 \pm 0,001 \text{ h}^{-1}$  para TIO-NC e TIO-R-NC. Ao final de 72 h de experimento, ambas as formulações liberaram cerca de 60 % do tioconazol total no estudo utilizando saco de diálise. Estes resultados corroboram com os verificados na classificação da distribuição do fármaco na nanocápsulas (modelo VI), uma vez que há uma liberação mais acentuada do fármaco nas primeiras horas, provavelmente correspondendo à localização do fármaco na interface, seguido de uma liberação sustentada, que por sua vez, corresponde à quantidade de fármaco internalizada no núcleo oleoso.

O modelo que melhor representa a difusão do tioconazol através da membrana hidrofóbica para as nanocápsulas foi o de primeira ordem ( $\ln C_t = \ln C_0 + k_{IT}$ ;  $r = 0,97 \pm 0,00$  para TIO-R-NC e  $r = 0,95 \pm 0,00$  para TIO-NC), sugerindo velocidades de liberação de  $0,73 \pm 0,02 \text{ h}^{-1}$  e  $0,75 \pm 0,05 \text{ h}^{-1}$  para TIO-NC e TIO-R-NC, respectivamente. No final de 72 h de experimento, foi possível observar uma liberação de, aproximadamente, 50% do total de fármaco (Figura 3). Tanto para o saco de diálise como para a membrana de silicone, o tioconazol difundiu-se de forma livre a partir da solução (TIO-S), em que uma liberação de 90% ocorreu nas primeiras 24 h de estudo, assumindo um platô nos tempos subsequentes.

Para as formulações ungueais os resultados demonstram que todas permitiram a transposição do tioconazol para o meio receptor (Figura 4) e foram avaliados segundo os modelos cinéticos de ordem zero, primeira ordem (mono-exponencial e bi-exponencial), Higuchi e Korsmeyer-Peppas. O modelo que melhor representou a cinética de difusão do fármaco para L-TIO-R-NC foi o de Higuchi ( $r = 0,99 \pm 0,01$ ), demonstrando uma velocidade de  $3,94 \pm 0,96 \text{ h}^{-1}$ , permitindo a difusão de cerca de 30% total do fármaco em 72 h. Os controles avaliados (L-TIO e Trosid<sup>®</sup>) demonstraram uma cinética exponencial semelhante, nos quais a difusão do tioconazol foi de cerca de 60% nas primeiras 34 h.

A diferença em torno de 10% em relação ao percentual de tioconazol quantificado no meio de liberação ao final de 72 h para as metodologias utilizadas (em torno de 60% para o

saco de diálise e cerca de 50% para a membrana de silicone) ( $p > 0,05$ ), pode estar relacionada à diferença na quantidade de fármaco aplicado por área de difusão de cada barreira (0,08 mg/cm<sup>2</sup> para o saco de diálise e 0,16 mg/cm<sup>2</sup> para a membrana de silicone). Além disso, o primeiro experimento avalia a liberação do fármaco a partir das nanocápsulas, tendo em vista que pelo tamanho de poro (12 kDa), as nanocápsulas ficam retidas no interior do saco, permitindo somente a passagem do fármaco não associado. Já a membrana de silicone avalia a transposição do tioconazol, não diferindo do tioconazol associado do não-associado às nanocápsulas. No entanto, não se pode confirmar que as nanocápsulas atravessaram a barreira, uma vez que não foi observado turbidez do meio de liberação durante o período do experimento.

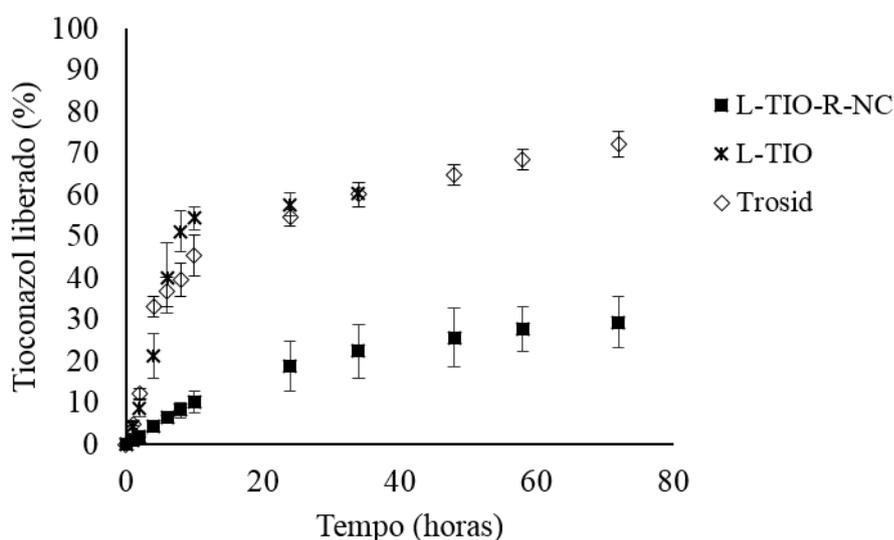


Figura 4. Perfis de liberação do tioconazol associado às nanoestruturas a partir das formulações ungueais (L-TIO-R-NC), do fármaco não associado (L-TIO) e da formulação comercial (Trosid<sup>®</sup>) durante 72 h (n = 3).

#### 4.6 ESTUDOS *IN VITRO* DE PERMEACÃO UNGUEAL

Os estudos de permeação ungueal foram conduzidos para as suspensões coloidais (TIO-NC, TIO-R-NC) e para a formulação ungueal (L-TIO-R-NC), incluindo os respectivos controles (TIO-S, L-TIO e Trosid<sup>®</sup>).

Para todos os protocolos testados não foi possível a quantificação do tioconazol no meio receptor. Sabe-se da baixa permeabilidade de substâncias através da unha (SHIVAKUMAR et al., 2013). Para que se obtenha o sucesso no tratamento de onicomicoses é imprescindível que o antifúngico alcance as hifas do fungo, que se encontram entrelaçadas

às fibras de queratina, na matriz ungueal, ou ainda entre a matriz e o leito (BARAN; KAOUKHOV, 2005). Assim, o desenvolvimento de terapias tópicas efetivas para o tratamento das onicomicoses continua sendo um desafio. No entanto, conhecer a concentração do fármaco retida na matriz ungueal é de suma importância, uma vez que a ação antifúngica do tioconazol está relacionada com a concentração por ele encontrada no sítio de ação (BEGGS, 1984). A quantidade de tioconazol retida na placa ungueal após exposição às formulações em estudo está disposta na Tabela 3. Levando em consideração a concentração inibitória mínima (CIM) do tioconazol requerida para os principais agentes etiológicos causadores de onicomicoses (4,6 µg/mL para *C. albicans*; 0,5 µg/mL para *T. rubrum* e 0,1 µg/mL para *T. mentagrophytes*) (JERVONS et al., 1979), as formulações desenvolvidas, independente do protocolo seguido, apresentaram valores do fármaco retido nas unhas superiores à CIM requerida. Além disso, pode-se observar que ao aplicar diariamente as formulações, obteve-se uma maior recuperação de fármaco, comparando-se com os outros protocolos ( $p \leq 0,05$ ).

Tabela 3. Quantidade de tioconazol aplicada (TIOA) e quantidade de fármaco extraída por grama de unha (TIO/unha), utilizando células de Franz com aplicação única das formulações e células *in-line* com aplicação única e diária (média ± DP)

		TIO-NC	TIO-R-NC	TIO-S	L-TIO-R-NC	Trosid®
Cél. Franz	TIOA (µg)	1000	1000	1000	-	-
	TIO/unha (µg/g)	151 ± 17 <sup>a</sup>	348 ± 11 <sup>b</sup>	108 ± 20 <sup>a</sup>	-	-
Cél. <i>in-line</i> (única)	TIOA (µg)	300	300	300	100	-
	TIO/unha (µg/g)	198 ± 16 <sup>a</sup>	226 ± 20 <sup>a</sup>	116 ± 13 <sup>b</sup>	47 ± 6 <sup>c</sup>	-
Cél. <i>in-line</i> (diária)	TIOA (µg)	300	300	300	100	28300
	TIO/unha (µg/g)	438 ± 24 <sup>a</sup>	556 ± 18 <sup>b</sup>	246 ± 20 <sup>c</sup>	583 ± 30 <sup>b</sup>	6019 ± 1375 <sup>d</sup>

\* Letras diferentes na mesma linha indicam que os resultados são estatisticamente diferentes ( $p \leq 0,05$ ).

Comparando as formulações desenvolvidas com a formulação comercial Trosid<sup>®</sup> e levando em consideração a quantidade total de fármaco aplicada em sete dias (TIOA<sub>7</sub>) e o total de fármaco quantificado na unha (TIO), o percentual de fármaco recuperado (TIOR%) foi calculado (Tabela 4).

Tabela 4: Quantidade de tioconazol em sete dias de aplicação diária das formulações (TIOA<sub>7</sub>), quantidade total de tioconazol recuperado da unha (TIO) e percentual de tioconazol recuperado (TIOR%) (n=3, média ± DP)

	TIO-NC	TIO-R-NC	TIO-S	L-TIO-R-NC	Trosid <sup>®</sup>	
Cél. in-line (diária)	TIOA <sub>7</sub> (µg)	2100	2100	2100	700	198100
	TIO (µg)	4,57 ± 0,01	6,22 ± 0,21	1,83 ± 0,02	9,10 ± 0,31	60 ± 12
	TIOR%	0,21	0,30	0,15	1,3	0,03

O nanoencapsulamento do tioconazol garantiu uma maior recuperação do fármaco após aplicação diária das formulações ( $p \leq 0,05$ ). Quando associado às nanocápsulas revestidas, o percentual de fármaco recuperado foi duas vezes maior que para o fármaco em solução; para as nanocápsulas não-revestidas, a quantidade foi 1,4 vezes superior (Tabela 4). Comparando as formulações ungueais, é evidente o superior desempenho da formulação contendo as nanocápsulas revestidas (L-TIO-R-NC), demonstrando um percentual de recuperação 43 vezes maior em relação à formulação comercial Trosid<sup>®</sup> ( $p \leq 0,05$ ).

Quando a posologia sugerida pelo fabricante para Trosid<sup>®</sup> foi conduzida (aplicando duas vezes ao dia), a quantidade de fármaco aplicada no final de sete dias foi em torno de 11900 µg, com cerca de 0,42% de recuperação de fármaco, representando uma recuperação 3 vezes menor que a obtida para L-TIO-R-NC ( $p \leq 0,05$ ), ainda que a nova formulação tenha sido aplicada somente uma vez ao dia (Tabela 4).

A partir da avaliação dos resultados, pode-se inferir que a veiculação do tioconazol às nanocápsulas permitiu que o fármaco permanecesse solúvel e sua subsequente liberação ungueal. Este parece ser um ponto-chave uma vez que o Trosid<sup>®</sup>, por ser constituído de solventes orgânicos, que evaporam rapidamente, acabam favorecendo a formação de cristais

do fármaco. Estes cristais são incapazes de penetrar na placa ungueal e podem ser facilmente removidos da placa da unha.

Devido a interessantes resultados encontrados na literatura acerca da microporação do estrato córneo melhorando a permeação de substâncias na pele (TUAN-MAHMOOD et al., 2013) e unhas (CHIU et al., 2015), a microporação, como um pré-tratamento às unhas foi estudada. Ao final de 7 dias, a presença de microporos na placa ungueal não exerceu influência na permeação do tioconazol e o fármaco não pôde ser quantificado no meio receptor. Tampouco influenciou na quantidade de fármaco recuperada da placa ungueal ( $p > 0,05$ ). Entretanto, foi possível observar, novamente, que a aplicação diária foi mais eficaz ( $p \leq 0,05$ ) (Tabela 5).

Tabela 5. Quantidade de tioconazol aplicada (TIOA) e quantidade de fármaco extraída por grama de unha (TIO/unha), em células *in-line* com aplicação única e diária das formulações nas unhas microporadas (média  $\pm$  DP)

		TIO-NC	TIO-R-NC	L-TIO-R-NC
in-line Cél. (única)	TIOA ( $\mu\text{g}$ )	300	300	100
	TIO/unha ( $\mu\text{g/g}$ )	$238 \pm 16^a$	$263 \pm 8^a$	$35 \pm 3^b$
in-line Cél. (diária)	TIOA ( $\mu\text{g}$ )	2100	2100	700
	TIO/unha ( $\mu\text{g/g}$ )	$345 \pm 27^a$	$602 \pm 197^b$	$446 \pm 32^c$

\*Letras diferentes na mesma linha indicam que os resultados são estatisticamente diferentes ( $p \leq 0,05$ ).

#### 4.7 MICROSCOPIA CONFOCAL DE VARREDURA A LASER (MCVVL)

A unha é composta por três camadas, cada uma apresentando características próprias e também permeabilidades diferentes (ELKEEB; MAIBACH, 2013). Observou-se que o tioconazol não atravessou a placa da unha, entretanto, diferentes concentrações do fármaco foram quantificadas na placa ungueal após a aplicação das formulações. Dessa forma, seria interessante verificar a profundidade alcançada pelo tioconazol a partir das diferentes formulações. Para simular a penetração do tioconazol na placa ungueal a partir das nanopartículas e da nova formulação ungueal desenvolvida, um marcador fluorescente

lipofílico, Vermelho do Nilo (NR), substituiu o tioconazol nas formulações para as análises de MCVL e estas apresentaram diâmetro médio em torno de 190 nm. Este marcador apresenta fluorescência vermelha quando excitado a 543 nm. Estudos foram realizados para verificar a habilidade das novas formulações em permitir a difusão do marcador através de uma barreira hidrofóbica. O perfil de liberação do NR a partir das formulações demonstrou que todas as formulações permitiram a difusão do marcador até 72 h, sendo que as formulações revestidas apresentaram maior controle na difusão do NR.

A distribuição do NR através da placa da unha após o tratamento com as formulações contendo o marcador foi observada ao final de sete dias de exposição às formulações, seguindo aplicação única e diária em unhas íntegras, e aplicação diária das formulações em unhas microporadas. Para mensurar a profundidade de penetração do mercador, foram realizadas 10 medições por corte transversal (n=3) de unha. A Tabela 6 demonstra a profundidade de penetração do corante na unha sob os diferentes protocolos. Pode-se observar que a profundidade de penetração do marcador foi similar ( $p > 0,05$ ) para a aplicação única e diária (cerca de 147  $\mu\text{m}$  e 121  $\mu\text{m}$ , respectivamente). Inesperadamente, a penetração do NR não foi influenciada pela presença de microporos nas unhas (cerca de 107  $\mu\text{m}$ ). A Figura 5 demonstra as imagens transversais das unhas tratadas diariamente com as formulações contendo o marcador.

Tabela 6. Profundidade de penetração ( $\mu\text{m}$ ) na placa ungueal do NR após sete dias de exposição às formulações L-NR-R-NC, NR-R-NC, NR-NC e NR-S, seguindo aplicação única e diária em unhas íntegras, e diária em unhas microporadas (10 medições por corte transversal, n=3, média  $\pm$  SD)

Protocolo	L-NR-R-NC	NR-R-NC	NR-NC	NR-S
Única	-	146 $\pm$ 9 <sup>a</sup>	131 $\pm$ 7 <sup>a</sup>	163 $\pm$ 8 <sup>a</sup>
Diária	122 $\pm$ 6 <sup>a</sup>	127 $\pm$ 5 <sup>a</sup>	103 $\pm$ 26 <sup>a</sup>	131 $\pm$ 28 <sup>a</sup>
Microporadas/diária	111 $\pm$ 27 <sup>a</sup>	99 $\pm$ 18 <sup>a</sup>	93 $\pm$ 9 <sup>a</sup>	125 $\pm$ 26 <sup>a</sup>

\*Letras diferentes na mesma linha indicam que os resultados são estatisticamente diferentes ( $p \leq 0,05$ ).

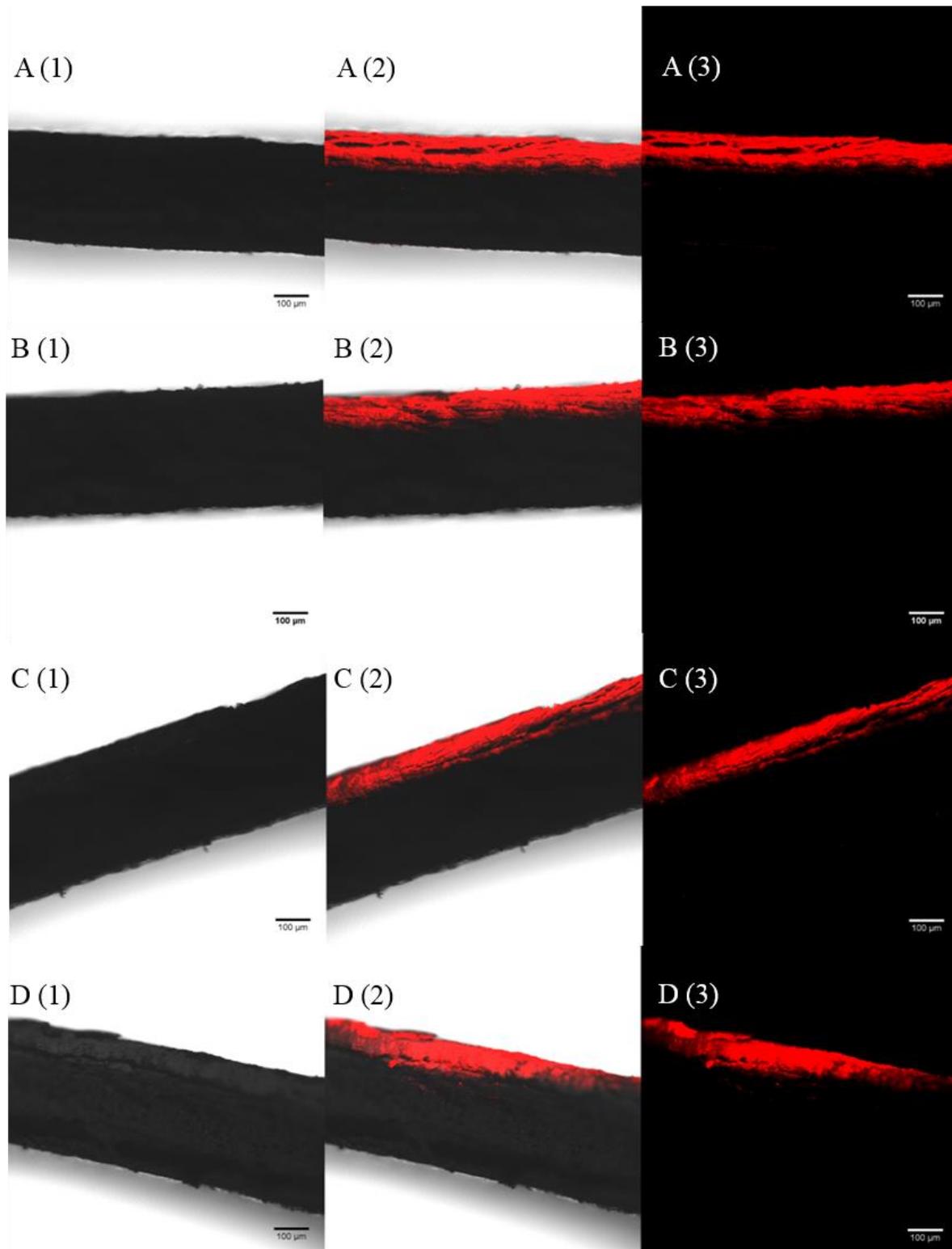


Figura 5: Imagens ilustrativas das unhas seccionadas transversalmente: (1) imagens ópticas das unhas integrais tratadas; (2) imagens ópticas e imagens fluorescentes do NR mescladas; (3) fluorescência do NR após tratamento diário com: A) L-NR-R-NC; B) NR-R-NC; C) NR-NC; D) NR-S. Barra = 100 µm.

Não foram observadas diferenças entre as formulações, tampouco para os protocolos utilizados (aplicação única e diária), ou em relação à microporação ( $p > 0,05$ ) (Tabela 6).

Levando-se em consideração que as profundidades de penetração variaram de 100 a 150  $\mu\text{m}$  para as unhas não-microporadas (Tabela 6) e que a espessura das unhas utilizadas apresentava em torno de 250-300  $\mu\text{m}$ , pode-se inferir que a profundidade de penetração foi de mais de 30% da espessura total da unha. A proporção entre as camadas da unha é de 3:5:2 (camadas dorsal, intermediária e ventral, respectivamente), sendo que a porção ventral representa a camada mais importante em termos de barreira à penetração (KOBAYASHI et al., 1999). Sendo assim, se o marcador alcança mais de 30% de penetração na placa ungueal, pode-se inferir que a principal barreira à permeação foi superada. Tendo em vista que a permeação do marcador fluorescente na unha íntegra aumenta em função do tempo (CHIU et al., 2015), ao ultrapassar a principal camada de barreira à permeação, o NR poderia, por hipótese, continuar penetrando (devido à liberação controlada conferida pelas nanocápsulas) até atingir as camadas subsequentes. Diferentemente do que foi observado neste trabalho, Chiu e colaboradores (2015) observaram papel positivo dos microporos na penetração do marcador.

As imagens planares x-y da fluorescência do NR (Figura 6) mostram a forma poliédrica dos onicócitos da placa ungueal. Pode-se observar a localização do marcador fluorescente na periferia das células ungueais, nas regiões intercelulares, inferindo que a permeação do pigmento através da placa ungueal ocorre através da via intercelular. É de se esperar esta localização do marcador, uma vez que se trata de uma região com uma grande concentração lipídica (MURTHY; MAIBACH, 2013; CHIU et al., 2015). A presença dos microporos não influenciou no percurso do marcador através da placa ungueal.

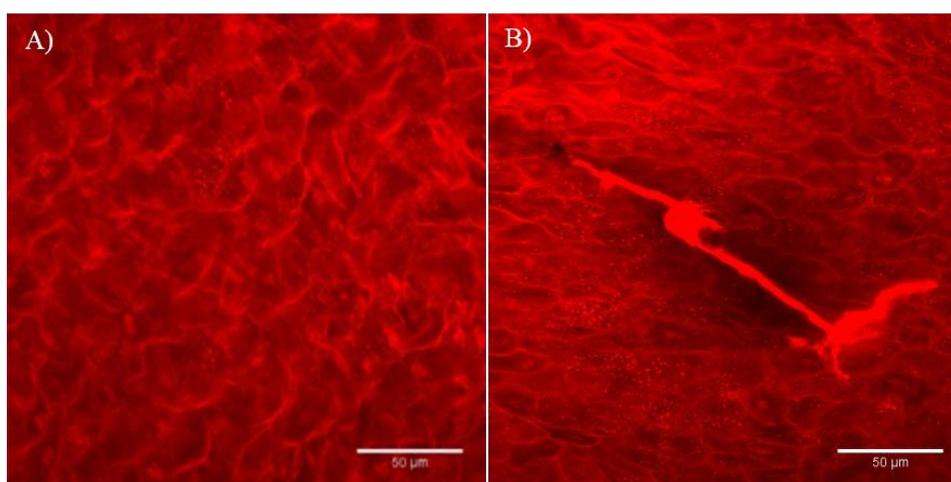


Figura 6. Imagens planares (x-y) de (A) placa da unha intacta e (B) placa da unha com microporos a  $\sim 20 \mu\text{m}$  de profundidade demonstrando a disposição do NR seguindo sete dias de experimento envolvendo aplicação diária de NR-S. Barra = 50  $\mu\text{m}$ .

#### 4.8 AVALIAÇÃO DA EFICÁCIA DAS FORMULAÇÕES DESENVOLVIDAS EM MODELO *IN VITRO* DE ONICOMICOSE

Para avaliar se as concentrações de tioconazol retidas na unha eram suficientes para estabelecer uma concentração em níveis efetivos, as formulações ungueais foram avaliadas quanto a sua eficácia em modelo de onicomicose por *T. rubrum*. As formulações foram aplicadas diariamente na parte dorsal da unha. Após 15 dias, todas as unhas que receberam tratamento com salina (controle positivo) apresentaram a infecção fúngica, claramente evidenciada pela presença do micélio branco na superfície, nas bordas e na parte ventral da unha (que mantinha contato com o ágar inoculado) (Figura 7A). Para as unhas tratadas com a formulação ungueal (L-TIO-R-NC), dos 6 fragmentos tratados, 5 apresentaram o crescimento das unidades formadoras de colônia restrito ao ágar, não avançando para as unhas, e em somente um fragmento houve ascensão do fungo para a parte ventral (Figura 7C), entretanto, não foi confirmada a infecção, uma vez que não atingiu a parte ventral (Figura 7D). Para as unhas tratadas com a formulação comercial, todas apresentaram crescimento restrito ao ágar (Figura 7B). Assim, as formulações ungueais desenvolvidas (L-TIO-R-NC) foram aptas em prevenir a infecção fúngica nas unhas e tiveram sua eficácia comparada à formulação comercial, sendo que a concentração de tioconazol nas formulações ungueais nanoestruturadas era de 1 mg/mL, enquanto que para a formulação comercial a concentração era de 283 mg/mL.

O grande desafio para a terapia antifúngica é permear a barreira ungueal, disseminar através da unidade da unha e acumular e manter concentrações efetivas nos estratos mais profundos, em concentrações superiores às CIM (DEBRUYNE; COQUEREL, 2013). Estudos demonstram que a veiculação de antimicrobianos em sistemas nanoestruturados foram capazes de reduzir em até 8 vezes a CIM do fármaco (MOHAMMADI et al., 2001). Além disso foi observada eficácia superior no controle de infecções fúngicas *in vivo* para antifúngicos veiculados à nanopartículas, em relação ao fármaco livre (PENG et al., 2008; VAN de VEN et al., 2012; BHATA et al., 2012). A habilidade dos sistemas nanoestruturados em manter o tioconazol solúvel e liberá-lo de uma forma controlada e prolongada na placa ungueal facilita a transposição destes obstáculos, diferentemente da formulação comercial, constituída de solventes orgânicos que ao evaporarem rapidamente acabam promovendo a formação de cristais de fármaco, incapazes de penetrar na unha, além de serem facilmente removíveis. Estudos demonstram que formulações que aumentam a hidratação da unha tem o potencial de aumentar a permeabilidade, havendo um relaxamento entre as fibras de queratina

(GUNT; KASTING, 2007), causando sua expansão e a consequente formação de poros (MURDAN, 2002). Cabe salientar que a formulação ungueal é uma formulação de base aquosa, capaz de promover uma maior hidratação à placa ungueal. Adicionalmente, L-TIO-R-NC é formado por nanocápsulas catiônicas bioadesivas e também conta com a presença do Pulullan, um polissacarídeo com capacidades bioadesivas (CHENG; DEMIRCI; CATCHMARK, 2011) e de formação de filme (DIONÍSIO et al., 2013).

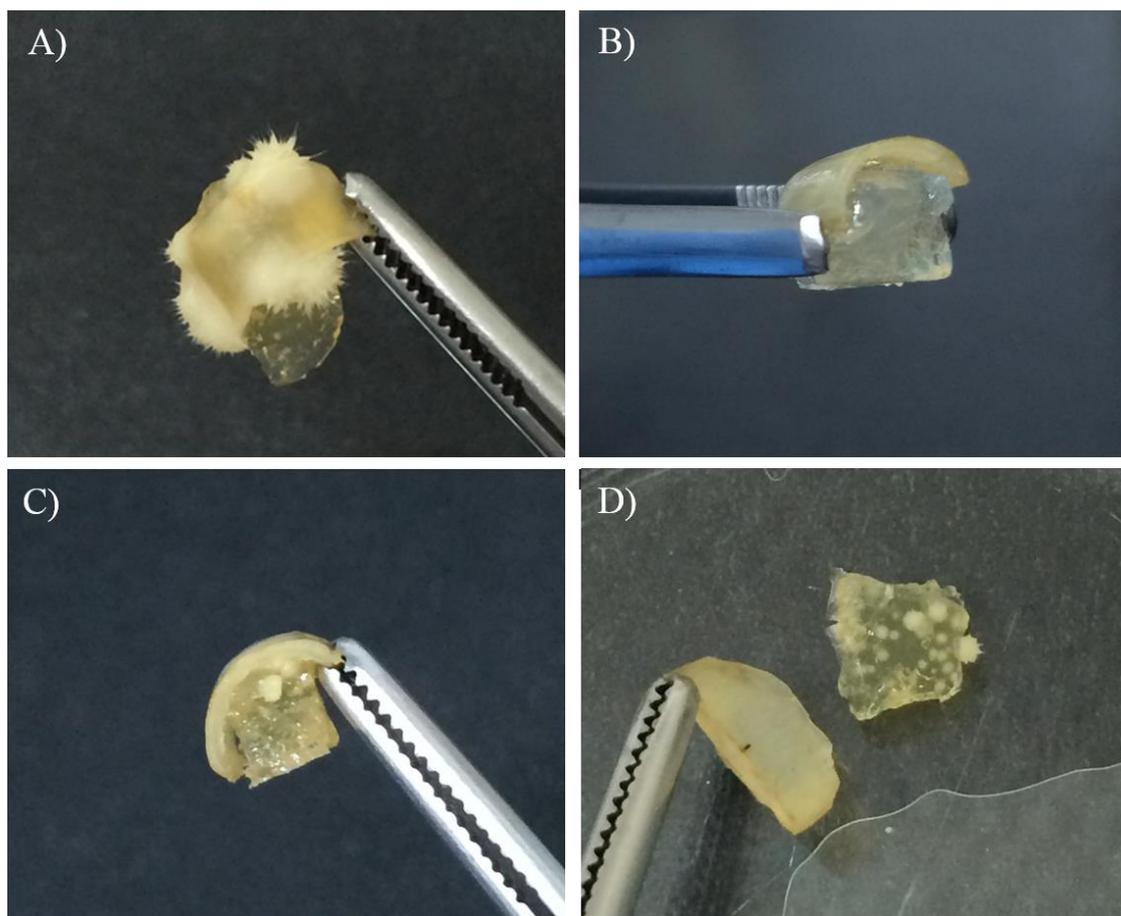


Figura 7. Modelo de onicomicose causada por *T. rubrum*. Fragmento de unha sem tratamento (A); tratamento com Trosid<sup>®</sup> (B); tratamento com a formulação ungueal (C); visão ventral de unha após tratamento com a formulação ungueal (D).

#### 4.9 AVALIAÇÃO DO POTENCIAL DE IRRITAÇÃO DAS FORMULAÇÕES

A metodologia de HET-CAM vem sendo explorada para a avaliação do potencial irritante de substâncias veiculadas à nanopartículas (ARAÚJO et al., 2009; FELIPPI et al., 2012; SAVIAN et al., 2015). As formulações foram testadas quanto ao seu potencial irritativo a partir da aplicação direta das mesmas na membrana cório-alantóide, e após calculado o índice de HET-CAM, foram avaliadas como não irritante, levemente irritante, irritante e

muito irritante, conforme a Tabela 1. As formulações desenvolvidas foram comparadas ao controle positivo (LSS a 1%), classificado como muito irritante, ao apresentar índice de HET-CAM de  $10,24 \pm 0,19$ , e ao controle negativo (NaCl 0,9%), classificado como não-irritante. As formulações de nanocápsulas revestidas e não-revestidas, e a formulação ungueal sem a presença do fármaco não originaram eventos irritantes na membrana após cinco minutos de observação, demonstrando a inocuidade das matérias-primas utilizadas na preparação das formulações. Está bem documentado que dentre os principais efeitos adversos do tioconazol estão a irritação cutânea, e o desenvolvimento de dermatites de contato, reações que são proporcionais ao aumento da concentração do fármaco (STUBB et al., 1992; SWEETMAN, 2006). A solução de tioconazol (1 mg/mL) apresentou índice de HET-CAM de  $9,58 \pm 0,21$ , sendo assim classificada como muito irritante. Entretanto, ao veicular o tioconazol às suspensões de nanocápsulas, estas acabaram por reduzir o potencial irritante do fármaco, sendo classificadas como ligeiramente irritantes (índice de HET-CAM de  $2,78 \pm 0,15$  para TIO-NC e de  $3,67 \pm 0,12$  para TIO-R-NC). Além disso, ao incorporar as nanocápsulas revestidas à formulação ungueal (L-TIO-R-NC), estas demonstraram índice de HET-CAM de  $2,20 \pm 0,09$ , podendo ser classificadas como ligeiramente irritante. Os resultados encontrados para a formulação ungueal proposta neste trabalho encontram-se muito abaixo aos calculados para a formulação comercial Trosid<sup>®</sup> (283 mg/mL), a qual foi classificada como irritante, apresentando índice de HET-CAM de  $7,34 \pm 0,08$ . Os resultados obtidos demonstram a vantagem conferida pelas nanocápsulas poliméricas no sentido de reduzir o potencial irritante do tioconazol. Não obstante, a formulação ungueal desenvolvida demonstrou ser menos irritante que a formulação comercial.

## 5 CONCLUSÃO

As suspensões de nanocápsulas poliméricas contendo como núcleo oleoso TCM foram desenvolvidas para liberação ungueal de tioconazol e apresentaram características adequadas e atividade antifúngica *in vitro* semelhante à do fármaco não-associado. As nanopartículas revestidas com quitosana apresentaram maior viscosidade e foram selecionadas para o desenvolvimento de uma formulação ungueal inédita. A formulação ungueal apresentou características físico-químicas adequadas para aplicação nas unhas. As novas formulações contendo a associação do tioconazol à nanocápsulas poliméricas (TIO-NC, TIO-R-NC e L-TIO-R-NC) mostraram-se capazes de liberar o tioconazol na unha humana. A formulação líquida ungueal (L-TIO-R-NC) provou ser mais eficiente em relação ao produto comercial

(contendo o tioconazol não associado ao nanocarreador) em termos de percentual de recuperação do fármaco. A microporação como pré-tratamento não aumentou a quantidade de fármaco retido na unha. A localização do marcador fluorescente na periferia dos onicócitos, nas regiões intercelulares, indica que a permeação de substâncias lipofílicas ocorre através desta via. Ainda, as formulações desenvolvidas apresentaram eficácia semelhante à formulação comercial, com redução de 280 vezes na concentração do fármaco e com menor potencial irritativo.

### **Agradecimentos**

Fernanda C. Flores agradece à FAPERGS e CAPES pela concessão da bolsa de estudos e em especial ao programa Ciências sem Fronteiras e CNPq pela concessão da bolsa de Doutorado Sanduíche na Universidade de Bath.

### **Referências**

ARAÚJO, J.; VEGA, E.; LOPES, C.; EGEA, M. A.; GARCIA, M. L.; SOUTO, E. B. Effect of polymer viscosity on physicochemical properties and ocular tolerance of FB-loaded PLGA nanospheres. **Colloid and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 72, p. 48-56, 2009.

BARAN, R.; KAOUKHOV, A. Topical antifungal drugs for the treatment of onychomycosis: an overview of current strategies for monotherapy and combination therapy. **Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology**, v. 19, p. 21-29, 2005.

BECK, R.; GUTERRES, S.; POHLMANN, A. **Nanocosmetics and Nanomedicines: New Approaches for skin care**. Ed. Springer, 2011.

BEGGS, W. H. Fungicidal activity of tioconazole in relation to growth phase of *Candida albicans* and *Candida parapsilosis*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, p. 699-701, 1984.

BHATTA, R. S. et al. Mucoadhesive nanoparticles for prolonged ocular delivery of natamycin: In vitro and pharmacokinetics studies. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 432, p. 105-112, 2012.

BRASIL, Farmacopéia Brasileira V, **Anvisa**, 2010.

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

CHENG, K.C.; DEMIRCI, A.; CATCHMARK, J.M. Pullulan: biosynthesis, production, and applications. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 92, p. 29-44, 2011.

- COSTA, P.; LOBO, J. M. S. Modeling and comparison of dissolution profiles. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 13, p. 123-133, 2001.
- CRYER, J. R.; ROBINSON, C. J. In vitro study to establish the efficacy of 28% tioconazole solution (Trosyl) against *Trichophyton rubrum* and *Candida albicans*. **The Foot**, v. 7, p. 27-29, 1997.
- DIONÍSIO, M.; CORDEIRO, C.; REMUÑÁN-LÓPEZ, C.; SEIJO, B.; DA COSTA, A.M.R.; GRENHA, A. Pullulan-based nanoparticles as carriers for transmucosal protein delivery. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 50, p. 102-113, 2013.
- DEBRUYNE, D.; COQUEREL, A. Pharmacokinetics of Drugs in the nail apparatus. In **Topical Nail Products and Ungual Drug Delivery**; Murthy, S. N., Maibach, H. I., Eds.; Taylor & Francis Group, CRC Press, New York, p. 187-214, 2013.
- DUTET, J.; DELGADO-CHARRO, M. B. Assessment of iontophoretic and passive ungula penetration by laser scanning confocal microscopy. **Pharmaceutical Research**, v. 29, p. 3464-3474, 2012.
- ELKEEB, R.; MAIBACH, H. I. Bioengineering of the nail: Transonychia Water Loss and Imaging Techniques, an Overview. In **Topical Nail Products and Ungual Drug Delivery**; Murthy, S. N., Maibach, H. I., Eds.; Taylor & Francis Group, CRC Press, New York, p. 157-164, 2013.
- FELIPPI, C. C. et al. Safety and Efficacy of Antioxidants-Loaded Nanoparticles for an Anti-Aging Application. **Journal of Biomedical Nanotechnology**, v. 8, p. 316-321, 2012.
- FESSI, H. et al. Nanocapsule formation by interfacial polymer deposition following solvent displacement. **International Journal of Pharmaceutics**, v.55, n. 1, p. R1-R4, 1989.
- FLORES, F. C. et al. Antifungal activity of nanocapsule suspensions containing tea tree oil on the growth of *Trichophyton rubrum*. **Mycopathologia**, v. 175, p. 281-286, 2013.
- FONSECA, F. N. et al. Mucoadhesive Amphiphilic Methacrylic Copolymer-Functionalized Poly( $\epsilon$ -caprolactone) Nanocapsules for Nose-to-Brain Delivery of Olanzapine. **Journal of Biomedical Nanotechnology**, v. 11, p. 1–10, 2014.
- FROMTLING, R. A. Overview of medically important antifungal azole derivatives. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 1, p. 187–217, 1988.
- GUPTA, A. K.; TU, L. Q. Therapies for onychomycosis: A review. **Dermatologic Clinics**, v. 24, p. 375–379, 2006.
- GUNT, H.; KASTING, G. B. Effect of hydration on the permeation of ketoconazole through human nail plate *in vitro*. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 32, p. 254-260, 2007.
- GUTERRES, S. S.; ALVES, M. P.; POHLMANN, A. R. Polymeric nanoparticles, nanospheres and nanocapsules, for cutaneous applications. **Drug Target Insights**, v. 2, p. 147-157, 2007.

- HÄRTER, A. P. G. et al. Development of a method for determination of tioconazole associated with polymeric nanocapsules by liquid chromatography. **Quimica Nova**, v. 37, p. 996-999, 2014.
- JERVONS, S. et al. Antifungal activity of tioconazole (UK-20,349), a new imidazole derivative. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 5, p. 597-602, 1979.
- KAUR, I. P.; KAKKAR, S. Topical delivery of antifungal agents. **Expert Opinion in Drug Delivery**, p. 1-25, 2010.
- KOBAYASHI, Y. et al. *In vitro* permeation of several drugs through the human nail plate: relationship between physicochemical properties and nail permeability of drugs. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 21, p. 471-477, 2004.
- LUPKE, N. P. Hen's egg chorioallantoic membrane test for irritation potential. **Chemical Toxicology**, v. 23, n. 2, p. 287-291, 1985.
- MOHAMMADI, G. et al. Physicochemical and anti-bacterial performance characterization of clarithromycin nanoparticles as colloidal drug delivery system. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 88, p. 39– 44, 2011.
- MÜLLER, R. H. et al. Nanostructured lipid carriers (NLC) in cosmetic dermal products. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 59, p. 522–530, 2007.
- MURDAN, S. Drug delivery to the nail following topical application. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 236, p. 1- 26, 2002.
- MURDAN, S. Enhancing the nail permeability of topically applied drugs. **Expert opinion on drug delivery**, v. 5 (11), p. 1267-1282, 2008.
- MURTHY, S. N.; MAIBACH, H. I. **Topical Nail Products and Ungual Drug Delivery**. Taylor & Francis Group, CRC Press, New York, US, 2013.
- NOGUEIRAS-NIETO, L.; DELGADO-CHARRO, M. B.; OTERO-ESPINAR, F. J. Thermogelling hydrogels of cyclodextrin/poloxamer polypseudorotaxanes as aqueous-based nail lacquers: application to the delivery of triamcinolone acetonide and ciclopiroxolamine. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 83, p. 370-377, 2013.
- OLIVEIRA, C. P. et al. An algorithm to determine the mechanism of drug distribution in lipid-core nanocapsule formulations. **Soft Matter**, v. 9, p. 1141-1150, 2013.
- PENG, H.-S. et al. Voriconazole into PLGA nanoparticles: Improving agglomeration and antifungal efficacy. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 352, p. 29-35, 2008.
- REPKA, M. A.; MIDIDODDI, P. K.; STODGHILL, S. P. Influence of human nail etching for the assessment of topical onychomycosis therapies. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 282, p. 95-106, 2004.

RIGO, L. A. et al. Influence of the type of vegetable oil on the drug release profile from lipid-core nanocapsules and in vivo genotoxicity study. *Pharmaceutical Development and Technology*, v. 19, p. 789–798, 2014.

SANNA, V.; CARIA, G.; MARIANI, A. Effect of lipid nanoparticles containing fatty alcohols having different chain length on the ex vivo skin permeability of Econazole nitrate. *Powder Technology*, v. 201, p. 32–36, 2010.

SAVIAN, A. L. et al. Al. Dithranol-loaded lipid-core nanocapsules improve the photostability and reduce the in-vitro irritation potential of this drug. *Materials Science and Engineering C*, v. 46, p. 69–76, 2015.

SCHAR, R. K. Nail disorders – one of dermatology’s last frontiers. *Dermatologic Therapy*, v. 20, p. 1-2, 2007.

SIQUEIRA, N. M. **Desenvolvimento tecnológico e avaliação de penetração cutânea de benzofenona-3 a partir de nanocápsulas revestidas com quitosana.** 2008, 106 p. Dissertação de Mestrado (Universidade Federal do Rio Grande do Sul). Porto Alegre RS, 2008.

SHIVAKUMAR, H. N.; REPKA, M. A.; MURDAN, S.; MURTHY, NS. Topical Nail Formulations. In **Topical Nail Products and Ungual Drug Delivery**; Murthy, S. N., Maibach, H. I., Eds.; Taylor & Francis Group, CRC Press, New York, p. 61-86, 2013.

STUBB, S. et al. Contact allergy to tioconazole. *Contact Dermatitis*, v. 26, n. 3, p. 155-158, 1992.

SWEETMAN, S. C. **Martindale**: Guia Completa de Consulta Fármaco-Terapêutica. 2<sup>a</sup> ed. Barcelona: Pharma Editores, S.L. p. 588, 2006.

TAKEUCHI, H.; THONGBORISUTE, J.; MATSUI, Y; SUGIHARA, H.; YAMAMOTO, H; KAWASHIMA, Y. Novel mucoadhesion tests for polymers and polymer-coated particles to design optimal mucoadhesive drug delivery systems. *Advanced Drug Delivery Reviews*, v. 57, p. 1583-1594, 2005.

TUAN-MAHMOOD, T. M. et al. Microneedles for intradermal and transdermal drug delivery. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 50 (5), p. 623-637, 2013.

VEN, V. H. et al. PLGA nanoparticles and nanosuspensions with amphotericin B: Potent in vitro and in vivo alternatives to Fungizone and AmBisome. *Journal of Controlled Release*, v. 161, p. 795-803, 2012.

VENTURINI, C. G. et al. Co-encapsulation of imiquimod and copaiba oil in novel nanostructured systems: promising formulations against skin carcinoma. *Pharmaceutical Sciences*, v. 79, p. 36–43, 2015.

YANG, W.; WIEDERHOLD, N. P.; WILLIAMNS, R.O. Drug delivery strategies for improved azole antifungal action. *Expert Opinion on Drug Delivery*, v. 5 (11), p. 1199-1216, 2008.

**DISCUSSÃO GERAL**

---



## DISCUSSÃO GERAL

As infecções fúngicas superficiais ganham importância no cenário mundial devido à dificuldade de tratamento. A escolha do tratamento tópico ou sistêmico é definida pelo grau da lesão e estado imunológico do paciente. Quando há o acometimento de grandes áreas, cronicidade ou recorrência, se faz necessária a utilização da terapia sistêmica. Este tipo de terapia apresenta elevado índice de interações medicamentosas e efeitos adversos, incluindo toxicidade hepática (GUPTA; CHAUDHRY; ELEWSKI, 2003). Como alternativa à terapia sistêmica, surge a terapia tópica, isenta de interações medicamentosas, entretanto, carecedora de maior tempo de permanência do antifúngico no local de ação e alcance de concentrações efetivas, o que acaba gerando necessidade de emprego de altas concentrações do fármaco e com isso, o surgimento de efeitos adversos locais (SOUZA et al., 2012).

O tioconazol é um antifúngico de amplo espectro indicado para o tratamento tópico de micoses superficiais de pele na concentração de 1% e para onicomicoses é utilizado na forma de solução a 28%. Entretanto, para que seja efetivo no local de ação se faz necessário o emprego de elevadas concentrações do fármaco (FROMTLING, 1988), o que está intimamente relacionado com o surgimento de alergias de contato (STUBB et al., 1992; GUIN; KINKANNON, 1997).

Assim, aliando a necessidade de formulações mais efetivas para o tratamento de tais infecções, às desvantagens da utilização do tioconazol como baixa solubilidade aquosa e efeitos adversos locais, utilizou-se como ferramenta a nanotecnologia e a utilização de matérias primas de origem vegetal devido as suas diversas propriedades medicinais, no desenvolvimento de formulações inovadoras para o tratamento tópico de micoses superficiais.

Desse modo, o primeiro capítulo deste trabalho foi delineado no sentido de verificar a viabilidade tecnológica da obtenção de nanopartículas lipídicas sólidas e carreadores lipídicos nanoestruturados obtidos a partir de lipídeos vegetais para a liberação do tioconazol, as *Mangospheres*. A escolha dos lipídeos foi feita de modo a contemplar as características das lesões por micoses superficiais com as propriedades medicinais apresentadas pelos lipídeos. A manteiga de manga é um lipídeo sólido à temperatura ambiente (temperatura de fusão em torno de 37 °C) com altas propriedades umectantes, apresenta atividade cicatrizante e anti-inflamatória (MANDAWGADE; PATRAVALE, 2008a). Além disso, detém atividade antimicrobiana (KABUKI et al., 2000) e antioxidante (MAISUTHISAKIL; GORDON, 2009). O outro lipídeo eleito para o desenvolvimento das nanopartículas lipídicas foi o óleo de melaleuca por apresentar amplo espectro de ação antimicrobiana, incluindo atividades frente à

dermatófitos (CARSON, HAMMER; RILEY, 2006). Também possui atividade anti-inflamatória e cicatrizante (FLORES et al., 2014). Assim, as Mangoesferas combinam as vantagens conferidas pelas nanopartículas lipídicas em termos de liberação controlada e direcionada do fármaco e melhora nas propriedades do tioconazol, conjugadas com as ações antimicrobiana, cicatrizante e anti-inflamatória de ambos lipídeos.

Cabe salientar que, inicialmente, havia se pensado em utilizar também o óleo de copaíba para a obtenção de carreadores lipídicos nanoestruturados, devido às suas também reconhecidas atividades terapêuticas (VEIGA JR.; PINTO, 2002; PIERI et al., 2009). No entanto, durante os estudos de pré-formulação, observou-se uma certa incompatibilidade entre os componentes da formulação. Embora as formulações apresentassem tamanho de partícula, índice de polidispersão e potencial zeta adequados, apresentavam-se instáveis nos primeiros dias após a preparação. Assim, dando continuidade aos trabalhos, seguiu-se somente com as formulações contendo o óleo de melaleuca.

As Mangoesferas contendo, aproximadamente, 1,70 mg/mL de tioconazol foram preparadas pelo método de homogeneização à alta pressão (MÜLLER; MÄDER; GOHLA, 2000; SCHÄFER-KORTING, MEHNERT, KORTING, 2007; COLOMÉ et al., 2010) e caracterizadas por diferentes técnicas e metodologias. Foram conduzidos estudos de liberação do tioconazol e atividade antifúngica *in vitro*. Hidrogéis contendo tais nanocarreadores foram preparados e caracterizados, e a permeação cutânea do tioconazol a partir das formulações semissólidas foi avaliada.

As Mangoesferas apresentaram aspecto macroscópico homogêneo e leitoso com um intenso reflexo azulado devido ao movimento Brawniano das nanopartículas (efeito *Tyndall*) (SCHAFFAZICK et al., 2003). As suspensões coloidais apresentaram tamanho nanométrico (em torno de 100 nm) e índice de polidispersão inferior a 0,15, o que indica uma formulação monodispersa e homogênea (espectroscopia de correlação de fótons). Estudos de difratometria a laser demonstraram a ausência de micropartículas e evidenciaram uma distribuição monomodal de tamanho, sendo que mais de 70% das TIO-MGS e mais de 80% das TIO-TTO-MGS apresentaram tamanho de partícula inferior a 100 nm. Estudos da análise de rastreamento de nanopartículas foram também realizados. Esta técnica combina a microscopia eletrônica de transmissão e o espalhamento dinâmico de luz, e apontou um diâmetro médio de partícula de cerca de 110 nm. Assim, como os resultados da análise de rastreamento de nanopartículas corroboraram com as análises de espectroscopia de correlação de fótons e de difratometria a laser, a microscopia eletrônica de transmissão também demonstrou diâmetros semelhantes e revelou a morfologia esférica e homogênea das Mangoesferas, indicando que a

metodologia utilizada na preparação e a composição quali-quantitativa das formulações foram adequadas para um eficiente controle de tamanho de partícula e polidispersão. De acordo com o observado, a presença do óleo de melaleuca nas TIO-TTO-MGS, assim como a presença do tioconazol, não influenciou no tamanho das partículas ( $p \leq 0,05$ ). Colomé e colaboradores (2010) desenvolveram nanopartículas lipídicas de manteiga de cupuaçu e verificaram que utilizando a homogeneização a alta pressão (500 bar), o número de ciclos utilizados (3, 6 ou 9) e a concentração de lipídeos não influenciaram no tamanho de partícula, os quais permaneceram entre 140 e 170 nm. Venturini e colaboradores (2015), ao prepararem carreadores lipídicos nanoestruturados de manteiga de cupuaçu e óleo de copaíba para liberação de imiquimode, seguindo a mesma metodologia, porém utilizando uma pressão de 300 bar e 3 ciclos no homogeneizador a alta pressão, obtiveram tamanho de partícula semelhante ao obtido por Colomé e colaboradores (2010), para a mesma concentração lipídica. Os valores de potencial zeta foram negativos e a presença do tioconazol levou a uma redução nos potenciais de superfície ( $p \leq 0,05$ ).

Análises de espalhamento múltiplo de luz são úteis para identificar previamente fenômenos de instabilidade física como floculação, coalescência, cremagem e sedimentação. As alterações observadas (<5 %) no perfil gráfico do espalhamento múltiplo de luz, referentes ao fundo e ao topo da cubeta, para ambas as formulações, não são indicativos de instabilidade, sendo consideradas normais por se tratar de suspensões (CELIA et al., 2009). Resultados semelhantes, com alterações não relevantes no gráfico de espalhamento de luz são comumente observadas para os diferentes tipos de suspensões coloidais, sejam elas lipídicas (VENTURINI et al., 2015) ou poliméricas (VENTURINI et al., 2011; ZANOTTO-FILHO et al., 2013).

Ainda, no que se refere ao teor de tioconazol nas Mangoesferas, foram obtidas recuperações do fármaco de 82% a 87%. Valores inferiores a 90% são considerados normais levando em consideração a metodologia empregada, em que perdas durante o processo de obtenção podem ocorrer e estão de acordo com outros trabalhos reportados na literatura (SOUZA et al., 2011). A eficiência de associação do tioconazol às nanoestruturas foi considerada elevada (próximo a 100%) para ambas as formulações. Venturini e colaboradores (2015) obtiveram valores para eficiência de encapsulamento próximos a 100%. Entretanto, na literatura, menores taxas de associação de fármacos à nanopartículas lipídicas, normalmente abaixo de 80%, são observadas (SOUTO et al., 2004; GUPTA; VYAS, 2012). Estas diferenças podem ser explicadas pelo tipo de lipídeo empregado. As nanopartículas lipídicas, obtidas neste trabalho e as obtidas por Venturini e colaboradores (2015) foram produzidas a

partir de lipídeos de origem vegetal (manteiga de manga e manteiga de cupuaçu, respectivamente), os quais apresentam menor ponto de fusão e menor cristalinidade, permitindo uma melhor acomodação das substâncias ativas na matriz lipídica. Estes resultados demonstram a vantagem na preparação de nanopartículas lipídicas a partir de lipídeos de origem vegetal.

Os lipídeos sólidos, após a preparação das nanopartículas podem, em parte, cristalizar em modificações energéticas mais elevadas. Durante o armazenamento, estas modificações podem passar a ser de baixa energia, levando a modificações mais organizadas na estrutura. Com isso, o número de imperfeições na matriz lipídica é reduzido. Um importante fenômeno que surge em decorrência dessa melhor organização da matriz lipídica é a expulsão precoce do fármaco e a diminuição da capacidade carreadora da partícula (PARDEIKE; HOMMOS; MÜLLER, 2009). As Mangoesferas contendo tioconazol e seus respectivos controles (sem o fármaco), manteiga de manga e o fármaco foram analisados por difratometria de raio-x a fim de avaliar se o processo de produção e a mistura dos componentes levou a alterações da cristalinidade dos materiais. Os resultados demonstraram que após a preparação das Mangoesferas houve uma redução na cristalinidade. Além disso, as Mangoesferas contendo o óleo de melaleuca (TIO-TTO-MGS) apresentaram menor cristalinidade se comparado às formulações sem o óleo. Segundo Pardeike e colaboradores (2009), a mistura de lipídeos líquidos e sólidos leva à formação de uma estrutura menos organizada, formando clusteres amorfos, os quais permitem que a substância ativa fique “melhor acomodada”, prevenindo a expulsão precoce da mesma. Estes estudos contribuem para a expliação dos resultados obtidos nos estudos de liberação. As Mangoesferas foram aptas em controlar a liberação do tioconazol por um período de até 30 h, ocorrendo em duas fases. As formulações contendo o óleo de melaleuca proporcionaram um maior controle de liberação em relação às formulações sem o óleo. Estes resultados reforçam os resultados obtidos por difratometria de raio-x, que evidenciaram uma estrutura menos cristalina para as TIO-TTO-MGS em relação às TIO-MGS.

Após a caracterização das Mangoesferas e os estudos de liberação do tioconazol, a atividade antifúngica das formulações foi avaliada frente à *C. albicans* por difusão em ágar. A partir da medida dos halos de inibição de crescimento da levedura, concluiu-se que o processo de obtenção das nanopartículas não causou interferência na atividade antifúngica do tioconazol. Além disso, quando presente, o óleo de melaleuca agiu em sinergismo com o fármaco, produzindo maior efeito antifúngico.

A partir das Mangoesferas, as quais demonstraram características adequadas e promissoras para aplicação cutânea, foram desenvolvidas formulações semissólidas, como formas farmacêuticas para a veiculação das nanoestruturas, objetivando o tratamento tópico de micoses superficiais, especialmente as de pele. Os hidrogéis contendo as Mangoesferas apresentaram especto brilhante e homogêneo de coloração esbranquiçada e as que continham o óleo de melaleuca apresentaram um leve odor característico do mesmo. Os valores de pH foram levemente ácidos, compatíveis com o pH cutâneo (KIM et al., 2006) e o teor de fármaco foi de 100% em relação às Mangoesferas originais. A estabilidade física das nanoestruturas foi conservada após a preparação dos hidrogéis, entretanto, um pequeno aumento no tamanho médio de partícula foi verificado, o que é considerado aceitável tendo em vista a formação de uma rede reticular pela presença do agente geleificante (Carbopol<sup>®</sup> Ultrez 10 NF), podendo dificultar a redispersão das nanoestruturas (SANNA et al., 2010). Uma das vantagens conferidas pelos sistemas nanoestruturados é a possibilidade de formular uma forma farmacêutica de base aquosa para veiculação de substâncias lipídicas ou altamente lipossolúveis.

A distribuição do fármaco na pele é determinada pelas propriedades físico-químicas do fármaco e pela interação do veículo com o mesmo (MODDARESI et al., 2010). Para que se atinja a adequada distribuição da substância ativa no local desejado, é importante que esta se espalhe adequadamente e permita o maior contato possível com a área desejada (GARG et al., 2002), possibilitando, assim, que uma dose efetiva seja alcançada no local. As formulações semissólidas foram submetidas ao teste de espalhabilidade (RIGO et al., 2012) com o intuito de avaliar a espalhabilidade das mesmas quando uma força é aplicada. A presença das Mangoesferas não influenciou o perfil de espalhabilidade dos hidrogéis, entretanto, a presença do tioconazol nas nanoestruturas e no hidrogel base levou à um decréscimo no fator de espalhabilidade. As propriedades de fluxo de um semissólido também podem influenciar na liberação do fármaco no local de ação. Como esperado, os hidrogéis desenvolvidos nesta etapa do trabalho apresentaram comportamento de fluxo não-Newtoniano e o modelo matemático que melhor os representou foi o modelo de Casson, apresentando assim, características plásticas, comumente reportados quando Carbopol<sup>®</sup> Ultrez é utilizado com agente gelificante (MILÃO et al., 2003; LEE; MOTURI, LEE, 2009). As formulações semissólidas obtidas por Souto e colaboradores (2004b) a partir de NLS e CLN incorporados em diferentes agentes formadores de géis, também apresentaram características plásticas. Corroborando com os resultados obtidos para o fator de espalhabilidade, a presença do tioconazol nas Mangoesferas resultou em uma maior viscosidade. A relação entre viscosidade

e a espalhabilidade é esperada uma vez que formulações com menor fator de espalhabilidade são mais difíceis de espalhar por apresentarem-se mais viscosas.

Após a caracterização, os hidrogéis foram armazenados sob proteção da luz e à temperatura ambiente e, após 30 dias, os mesmos parâmetros foram reavaliados. De acordo com os resultados pode-se concluir que os hidrogéis contendo as Mangoesferas permaneceram estáveis por 30 dias.

Os fungos causadores de micoses superficiais possuem predileção pela queratina da pele, ali instalando-se. Mais especificamente, permanecem somente na camada mais superficial da pele, o estrato córneo, rico em queratina e longe do sistema imunológico (KANBE, 2008). Assim, é importante o conhecimento da distribuição do tioconazol nas camadas da pele após a sua aplicação. Após 8 h de estudo, o tioconazol não foi capaz de permear a pele, independente do hidrogel aplicado. Para os hidrogéis contendo as Mangoesferas, o tioconazol permaneceu concentrado no estrato córneo, na mesma concentração encontrada para os hidrogéis contendo o fármaco não associado, entretanto, com mínima exposição das camadas cutâneas mais profundas. No entanto, para os hidrogéis contendo o fármaco não associado, concentrações significativas de tioconazol foram observadas na epiderme viável e na derme. A presença do óleo de melaleuca nos carreadores lipídicos não influenciou na permeação do fármaco. A afinidade do tioconazol pelo estrato córneo está bem estabelecida na literatura. No entanto, não somente ao estrato córneo está restrita a distribuição do fármaco, podendo alcançar as camadas mais profundas (CARRILLO-MUÑOZ et al., 2010).

Dando continuidade aos estudos envolvendo o desenvolvimento de formulações inovadoras promissoras para o tratamento tópico de micoses de pele, o segundo capítulo do presente trabalho foi delineado. O óleo de copaíba foi escolhido devido às propriedades medicinais anteriormente descritas, podendo ser um aliado ao combate das infecções fúngicas superficiais. Neste capítulo foram desenvolvidas nanocápsulas poliméricas contendo como núcleo oleoso o óleo de copaíba para a liberação tópica do tioconazol. Além disso, foi estudado o revestimento catiônico das nanocápsulas, com o intuito de promover maior adesividade às nanocápsulas poliméricas a partir da interação eletrostática das cargas positivas conferidas pela quitosana com as cargas negativas da superfície cutânea.

Até o momento, não haviam relatos na literatura da obtenção de nanocápsulas poliméricas de PCL com o óleo de copaíba. Desse modo foi necessária a realização do estudo do inchamento do polímero para verificar se o óleo de copaíba não atuaria como solvente do polímero, o que acarretaria na desestruturação da parede polimérica. Os resultados

demonstraram a viabilidade da utilização do óleo de copaíba na produção de nanocápsulas de PCL.

Inicialmente, houve um extenso estudo de pré-formulação até que se chegasse às nanopartículas com as características desejadas. Diferentes composições de fases orgânicas foram testadas, avaliando-se a presença de monoestearato de sorbitano, lecitina de soja e a concentração de fármaco (1 mg/mL ou 2 mg/mL). Logo nos primeiros experimentos percebeu-se a necessidade da presença da lecitina de soja para gerar nanocápsulas negativamente carregadas, aptas a interagirem com a quitosana por meio de interações iônicas para a formação do revestimento catiônico. Estudos subsequentes foram conduzidos a fim de otimizar o revestimento catiônico levando em consideração a concentração do polímero e a de ácido. Percebeu-se que, quanto maior a concentração ácida da solução de quitosana, menor era a recuperação de tioconazol (uma base fraca). Partindo de uma concentração ácida de 3%, chegou-se à concentração ácida de 0,5%, solubilizando 1% de quitosana, contemplando uma recuperação de fármaco de 100%.

Dando continuidade aos estudos de pré-formulação, foram produzidas nanocápsulas poliméricas, todas com lecitina de soja, contendo monoestearato de sorbitano (TIO-NC<sub>1S</sub>, TIO-NC<sub>2S</sub>) ou não (TIO-NC<sub>1</sub>, TIO-NC<sub>2</sub>), contendo 1 mg/mL e 2 mg/mL de tioconazol, respectivamente. Todas as formulações descritas anteriormente foram, também, revestidas com quitosana (TIO-R-NC<sub>1S</sub>, TIO-R-NC<sub>2S</sub>, TIO-R-NC<sub>1</sub>, TIO-R-NC<sub>2</sub>) (Tabela 1).

As formulações foram caracterizadas e seus parâmetros físico-químicos acompanhados durante 30 dias. Para as formulações contendo 1 mg/mL de fármaco, somente as que apresentavam monoestearato de sorbitano não revestidas demonstraram-se instáveis nos primeiros 30 dias. Já para as formulações contendo 2 mg/mL, tanto as revestidas como as não revestidas demonstraram instabilidade, independente da presença do monoestearato de sorbitano. Dessa forma, os estudos subsequentes ocorreram somente para as formulações contendo 1 mg/mL de tioconazol.

Tabela 1. Composição quali-quantitativa das suspensões de nanocápsulas poliméricas sem revestimento catiônico para 10 mL de suspensão

Fase	Composição	TIO-NC <sub>1S</sub>	TIO-NC <sub>1</sub>	TIO-NC <sub>2S</sub>	TIO-NC <sub>2</sub>
Orgânica	PCL	0,1 g	0,1 g	0,1 g	0,1 g
	Monoestearato de sorbitano	0,0384 g	-	0,0384 g	-
	Lecitina de soja*	0,03 g	0,03 g	0,03 g	0,03 g
	Óleo de copaíba	0,33 mL	0,33 mL	0,33 mL	0,33 mL
	Tioconazol	0,01 g	0,01 g	0,02 g	0,02 g
	Acetona	25 mL	25 mL	25 mL	25 mL
	Aquosa	Polissorbato 80	0,0768 g	0,0768 g	0,0768 g
	Água U.P.	50 mL	50 mL	50 mL	50 mL

\*previamente solubilizada em 5 mL de etanol.

Ao se propor uma partícula totalmente diferente das anteriormente estudadas, e sabendo-se da importância do monoestearato de sorbitano no controle de liberação de fármacos (POHLMANN et al., 2013), foi de fundamental importância o estudo de liberação do tioconazol a partir das suspensões coloidais propostas. Resultados surpreendentes foram obtidos, demonstrando que, neste caso, a liberação do fármaco parece não ter sofrido influência pela presença do monoestearato de sorbitano no núcleo da partícula.

Assim, tendo em vista a maior estabilidade para as suspensões que não apresentavam monoestearato de sorbitano em sua composição, e a indiferença quanto a sua presença em termos de liberação do fármaco, as formulações eleitas para a continuidade dos estudos foram as nanocápsulas de óleo de copaíba contendo lecitina de soja, sem monoestearato de sorbitano, revestidas e não revestidas com quitosana, contendo 1 mg/mL de tioconazol que passaram a ser denominadas de TIO-R-NC<sub>COPA</sub> e TIO-NC<sub>COPA</sub>, respectivamente.

As nanocápsulas poliméricas apresentaram aspecto homogêneo leitoso com reflexo azulado e o pH foi ligeiramente ácido. O diâmetro médio de partícula foi medido por espectroscopia de correlação de fótons e demonstrou valores em torno de 170 nm, independentemente do revestimento catiônico, apresentando índice de polidispersão inferior a 0,15, indicando a adequada homogeneidade do sistema. O revestimento com quitosana gerou

suspensões com viscosidade superior às não revestidas, devido à natureza geleificante do polissacarídeo. Valores superiores de viscosidade foram observados por Siqueira (2008) para nanocápsulas revestidas com quitosana, em relação às não revestidas. O potencial zeta das formulações apresentou-se negativo para TIO-NC<sub>COPA</sub>, e como era de se esperar, positivo para TIO-R-NC<sub>COPA</sub>. O conteúdo de tioconazol ficou em torno de 100% para ambas as formulações e valores para eficiência de encapsulamento de cerca de 100% foram obtidos. Os parâmetros descritos acima foram acompanhados por 30 dias, sem alterações significativas durante este período, indicando a estabilidade dos sistemas desenvolvidos.

As suspensões poliméricas apresentaram controle de liberação do tioconazol sob um perfil biexponencial. No entanto, a velocidade de liberação foi 2,7 vezes maior para TIO-R-NC<sub>COPA</sub> na primeira fase do que para TIO-NC<sub>COPA</sub>. Isso acarretou, ao final de 30 h de experimento, em uma liberação cerca de 20% maior para as nanocápsulas revestidas. A maior liberação para TIO-R-NC<sub>COPA</sub> deve-se, provavelmente, à ionização do tioconazol em pH mais ácido, facilitando sua difusão. Estes resultados demonstram similaridades interessantes com as Mangoesferas, pois ao final de 30 h, TIO-R-NC<sub>COPA</sub> liberou cerca de 70% do total de fármaco, da mesma forma que TIO-MGS, enquanto que, aproximadamente, 50% de tioconazol foi liberado a partir das TIO-NC<sub>COPA</sub> e TIO-TTO-MGS. Cabe salientar que as condições utilizadas em ambos os experimentos foram as mesmas, embora as matérias-primas utilizadas na preparação das partículas fossem diferentes. Em ambas as situações, 100% do tioconazol em solução difundiu para o meio de liberação em 4 h. Venturini e colaboradores (2015) demonstraram que os carreadores lipídicos nanoestruturados apresentaram maior controle na liberação do fármaco se comparado às nanocápsulas poliméricas. Os autores atribuem esse resultado a uma maior afinidade do fármaco pelo lipídeo sólido em detrimento do lipídeo líquido. No presente trabalho os resultados demonstram que não houve diferença na liberação do tioconazol levando em consideração os mesmos tipos de nanoestruturas avaliados por Venturini e colaboradores (2015), carreadores lipídicos nanoestruturados (TIO-TTO-MGS) e nanocápsulas poliméricas (TIO-NC<sub>COPA</sub>), indicando adequada solubilidade do tioconazol no óleo de melaleuca e de copaíba.

Aplicando-se o algoritmo proposto por Oliveira e colaboradores (2013) determinou-se experimentalmente a distribuição do tioconazol nas nanocápsulas poliméricas a partir de sucessivas diluições das formulações e posterior avaliação do ultrafiltrado, após ultrafiltração-centrifugação das amostras. Foi possível classificar as nanocápsulas poliméricas como modelo VI, em que o fármaco se encontra majoritariamente localizado no núcleo oleoso e pequena parte na pseudo-fase, corroborando com os resultados obtidos nos estudos de liberação, onde

tanto para as nanocápsulas revestidas, como para as não revestidas, ocorreu uma fase de liberação mais rápida, seguida de uma fase de liberação mais lenta. A fase mais lenta de liberação indica a internalização do fármaco no núcleo oleoso, demonstrando sua alta afinidade pelo óleo de copaíba.

As nanocápsulas poliméricas foram revestidas com o intuito de conferir bioadesividade às mesmas e com isso, aumentar o tempo de permanência e o contato do tioconazol no estrato córneo. Dessa forma, o estudo proposto por Takeuchi e colaboradores (2005), baseado na interação da mucina em solução com as nanopartículas, foi conduzido. A interação entre a mucina e as nanocápsulas revestidas com quitosana alterou as propriedades de superfície das partículas. Assim, as nanocápsulas revestidas sofreram inversão da carga superficial, passando de positivas para negativas após a interação. O mesmo não ocorreu para as nanocápsulas dotadas, inicialmente, de cargas negativas, permanecendo negativas após o contato com a mucina. Além disso, o diâmetro médio das partículas revestidas aumentou em cerca de 60 nm após contato com a solução de mucina ( $p > 0,05$ ), indicando a interação entre a superfície das nanocápsulas e a mucina presente no meio. Para as TIO-NC<sub>COPA</sub>, não ocorreram mudanças em relação ao diâmetro. Essas mudanças em relação ao potencial de superfície e ao tamanho de partículas demonstram o potencial bioadesivo das TIO-R-NC<sub>COPA</sub>.

Após a caracterização das nanocápsulas poliméricas, demonstrando a viabilidade da obtenção e também do revestimento catiônico, as suspensões foram avaliadas quanto à atividade antifúngica e comparadas com uma solução do fármaco. O estudo foi realizado baseado na curva de inibição do crescimento de *C. albicans* em função do tempo, seguindo metodologia previamente validada em nosso grupo de pesquisa (FLORES; RIBEIRO; SILVA, 2015), utilizando a contagem em placas. Após 0, 4, 8, 12, 24 e 48 h de contato das formulações com a levedura, amostras foram coletadas e o acompanhamento da contagem das unidades formadoras de colônia foi realizado. As formulações revestidas e não revestidas foram hábeis em inibir o crescimento da levedura, mantendo a contagem das UFC semelhantes ao tempo inicial (cerca de  $10^4$  UFC/mL) por, no mínimo 48 h. Os resultados foram semelhantes aos encontrados para a solução de tioconazol. Cabe salientar que a concentração de fármaco utilizada correspondia à concentração inibitória mínima (CIM) do tioconazol para esta cepa (JERVONS, 1979). Este estudo permite inferir que o processo e os materiais empregados na obtenção das nanocápsulas, bem como, o posterior revestimento não interferiram na ação antifúngica do tioconazol. Sabe-se que o efeito antifúngico do tioconazol sofre interferência do pH do meio (BEGGS, 1984). Dessa forma, o revestimento com solução de quitosana na concentração de ácido utilizada não interferiu na ação do fármaco. Além

disso, levando-se em consideração os resultados obtidos nos experimentos de liberação, no qual se verificou a liberação completa do tioconazol após 4 h, quando em solução, enquanto que para as nanocápsulas, menos de 50 % da quantidade de fármaco havia sido liberada no mesmo período de tempo, pode-se, por hipótese, inferir que uma menor concentração de tioconazol é requerida para inibir o crescimento da levedura quando o mesmo está associado às nanocápsulas. Mesmo com 100% do fármaco disponível para exercer a ação antifúngica, a ação inibitória para TIO-S foi semelhante à ação de TIO-R-NC e TIO-NC, com menos de 50% de fármaco disponível no meio de liberação. Dessa forma, as nanocápsulas desenvolvidas atuariam como sistemas-reservatório, podendo, por hipótese prolongar a ação inibitória do tioconazol.

A efetividade do tioconazol depende das concentrações por ele alcançadas no local de ação. Devido à sua alta lipofilia, o que leva à uma baixa absorção, são necessárias doses elevadas do fármaco para se obter a ação desejada (FROMTLING, 1988). No entanto, as altas concentrações empregadas estão relacionadas com o surgimento de efeitos adversos, como alergias de contato. A positividade das reações adversas por tioconazol é tão alta a ponto de ser indicado como fármaco marcador para alergias de contato por imidazóis (HEIKKILA et al., 1996). Sabendo-se da potencialidade dos sistemas nanoestruturados em proteger o tecido frente à toxicidade da substância ativa, prevenindo ou reduzindo possíveis reações (GUTERRES; ALVES; POHLMANN, 2007), estudos *in vitro* de irritação foram conduzidos para a avaliação dessa propriedade, utilizando o teste de HET-CAM. O potencial de irritação das formulações (TIO-R-NC<sub>COPA</sub>, TIO-NC<sub>COPA</sub>) e solução hidroetanólica a 20% de tioconazol, na mesma concentração presente nas nanocápsulas, e seus respectivos controles foi avaliado após contato direto das mesmas com a membrana cório-alantóide de ovos no 9º dia de incubação. As nanocápsulas contendo tioconazol foram classificadas como pouco irritantes, ao passo que o fármaco em solução foi classificado como irritante. Pelo fato de todos os controles apresentarem-se como não irritantes, descarta-se a irritabilidade do etanol na concentração utilizada (20%). É conhecida a toxicidade de formulações contendo quitosana em culturas celulares devido à necessidade de ácido para a solubilização do polissacarídeo (DODANE; KHAN; MERWIN, 1999; FISHER et al., 2003). No entanto, a quantidade de ácido utilizada para a solubilização da quitosana foi mínima (0,5%), o que refletiu no baixo potencial irritativo destas formulações. Estes resultados demonstram a importância da veiculação do tioconazol nas nanocápsulas desenvolvidas, em reduzir a irritabilidade do tioconazol, neste caso, por agirem diminuindo o contato direto do fármaco com a membrana cório-alantóide. Estes resultados corroboram com outros estudos utilizando a mesma

metodologia. Savian e colaboradores (2015) demonstraram a redução da irritabilidade do ditranol quando associados a nanocápsulas de núcleo lipídico, ao mesmo passo que Gupta e colaboradores (2011) observaram efeitos não-irritantes de nanocápsulas de levofloxacin, objetivando aplicação ocular.

Após verificação da atividade antifúngica, bioadesividade e potencial de irritabilidade das suspensões de nanocápsulas contendo o óleo de copaíba, revestidas e não revestidas com quitosana, estudos subsequentes objetivaram o desenvolvimento de hidrogéis contendo as referidas nanoestruturas. Para a preparação destas formulações semissólidas, o polímero formador de gel utilizado foi hidroxietilcelulose, por ser não iônico e não apresentar incompatibilidades com as cargas positivas ou negativas das nanocápsulas poliméricas.

Os hidrogéis obtidos apresentaram características organolépticas satisfatórias, com pH levemente ácido, não sendo necessário o ajuste final, pois todos apresentaram valores compatíveis com a aplicação cutânea (SCHREML et al., 2014). As diferenças entre os valores de pH para HG-TIO-R-NC<sub>COPA</sub> e HG-TIO-NC<sub>COPA</sub>, devem-se às diferenças de pH referentes às suspensões originais. O teor de tioconazol foi próximo ao teórico, demonstrando uma recuperação de cerca de 100%, para ambos.

Estudos de reologia, viscosidade e espalhabilidade foram realizados segundo a mesma metodologia descrita para a avaliação dos hidrogéis contendo as Mangoesferas. Como esperado para formulações semissólidas, todos os hidrogéis apresentaram comportamento de fluxo não-Newtoniano, e o modelo que os melhor representou foi o de Hershel-Bulkley. De acordo com os parâmetros avaliados neste modelo pseudo-plástico, após a avaliação do índice de consistência, a presença do revestimento catiônico não influenciou na reologia, não havendo distinção entre os hidrogéis contendo as nanoestruturas, no entanto, foram diferentes em relação ao HG-TIO. Já para o índice de fluxo, não houve diferença entre os hidrogéis. Muitos fatores podem influenciar nas propriedades de fluxo de uma forma farmacêutica, dentre elas pH, temperatura, concentração e tipo do polímero formador de gel, adição de outros excipientes, dentre outros (LEE; MOTURI; LEE, 2009). Assim, as diferenças entre os modelos que melhor representam os hidrogéis contendo as Mangoesferas (Casson) e os hidrogéis contendo as nanocápsulas poliméricas (Hershel-Bulkley), pode ser explicado pela diferença entre os polímeros formadores de gel utilizados. O alcance da dose necessária após a aplicação tópica de um semissólido está relacionado com a espalhabilidade da formulação, garantindo um adequado contato com a área desejada (GARG et al., 2002). Os estudos de espalhabilidade avaliam a espalhabilidade de formulações frente a aplicação de uma determinada forma, além de fornecer informações a respeito da consistência dos produtos. As

formulações que apresentaram o maior fator de espalhabilidade (FE) foram os HG-TIO, seguidos de HG-TIO-NC<sub>COPA</sub>, e com o menor valor, HG-TIO-R-NC<sub>COPA</sub>. O valor do fator de espalhabilidade reflete na força necessária para a espalhar a formulação sob uma determinada superfície. Assim, quanto maior o FE, maior a força necessária para espalhar o produto. Percebe-se que a inclusão das nanocápsulas nos hidrogéis resultou na diminuição do FE, tornando a aplicação do semissólido mais fácil. Sendo assim, os HG-TIO-R-NC<sub>COPA</sub> demonstraram potencial para aplicação em regiões inflamadas e doloridas, características de alguns tipos de micoses superficiais. Estes resultados corroboram com os resultados de índice de consistência, demonstrando que quanto maior o índice de consistência, mais força é necessária para espalhar a formulação. Após estudo de estabilidade, concluiu-se que HG-TIO-R-NC<sub>COPA</sub> permaneceu estável durante 60 dias.

É de fundamental importância que a integridade física das nanocápsulas seja preservada após a incorporação nos hidrogéis, para que as vantagens conferidas por estes nanocarreadores possam de fato ser exploradas. Desse modo, os hidrogéis foram solubilizados em água para avaliação do diâmetro médio de partícula por espectroscopia de correlação de fótons. A partir do ensaio, verificou-se que as nanocápsulas poliméricas permaneceram intactas após a preparação dos hidrogéis, uma vez que diâmetros de partículas semelhantes aos das suspensões originais foram obtidos.

Confirmada a capacidade bioadesiva das suspensões de nanocápsulas revestidas e após a confirmação da integridade física das mesmas nos hidrogéis, outro objetivo do estudo foi avaliar se os hidrogéis contendo as nanocápsulas revestidas eram capazes de aderir mais intensamente a uma camada negativamente carregada (mucina). Para esta avaliação, foi utilizado o método de escoamento de líquidos (NIELSEN et al., 1998 adaptado por Lima, 2015). As formulações (HG-TIO-R-NC<sub>COPA</sub> e HG-TIO) foram aplicadas em uma superfície de mucina disposta de forma inclinada, sobre a qual o meio de liberação foi derramado sob fluxo contínuo e controlado a partir da parte superior do suporte, de modo a abranger toda a superfície onde a formulação fora aplicada. O hidrogel foi então removido por este líquido e coletado na parte inferior do suporte. A diferença entre a quantidade de tioconazol aplicada e coletada foi considerada indicativo da quantidade de formulação que permaneceu aderida no suporte de mucina. Cerca de 80% do tioconazol aplicado a partir do HG-TIO-R-NC<sub>COPA</sub> permaneceu aderido, em quanto que menos de 40% foi observado para HG-TIO. Estes resultados reiteram a importância do revestimento catiônico em proporcionar bioadesividade às formulações e também, a manutenção das nanopartículas revestidas na matriz do hidrogel.

Os estudos de permeação/penetração cutânea *in vitro* auxiliam no conhecimento de como será a distribuição do fármaco nas camadas da pele após aplicação das formulações semissólidas e como as diferentes nanoestruturas podem influenciar no processo de captação cutânea do fármaco. Após 8 h de estudo, no que se refere aos hidrogéis com o fármaco não associado, o tioconazol permeou através das camadas cutâneas atingindo o receptor em concentrações elevadas, embora a sua distribuição nas camadas da pele tenha sido ampla. O tioconazol liberado a partir dos HG-TIO atingiu altas concentrações no estrato córneo, derme e receptor, com menor concentração na epiderme viável. Quando associado às nanocápsulas poliméricas, o fármaco permaneceu mais concentrado no estrato córneo, alcançando mínimas concentrações nas camadas mais profundas e não sendo capaz de atingir o meio receptor. As nanocápsulas revestidas com quitosana apresentaram quantidades significativamente maiores do fármaco no estrato córneo, se comparadas às não revestidas. Essa diferença pode estar relacionada com a maior liberação do fármaco nas primeiras horas proporcionada pelas TIO-R-NC<sub>COPA</sub>, podendo também estar relacionado com a bioadesividade destas formulações. Os resultados demonstram o direcionamento do tioconazol ao estrato córneo, com reduzida exposição das camadas mais profundas promovidas pelo HG-TIO-R-NC<sub>COPA</sub>, ao contrário do que se observou para os HG-TIO.

Diferenças nos estudos de permeação/penetração foram observadas para as formulações semissólidas contendo as nanocápsulas poliméricas e as Mangoesferas, e também, em relação às formulações contendo o fármaco não associado. Cabe salientar que o polímero formador de gel utilizado em cada uma das situações foi diferente, podendo influenciar na permeação do fármaco. Comparando os hidrogéis contendo as Mangoesferas e os contendo as nanocápsulas poliméricas, percebe-se que todas as formulações promoveram o direcionamento do tioconazol ao estrato córneo, o que pode ser explicado pela formação do efeito reservatório, impedindo ou retardando a difusão de moléculas lipofílicas para as camadas de pele mais profundas, com maior quantidade de água. Para que ocorra o efeito reservatório, a substância deve estar amplamente difundida no estrato córneo (JEPPS et al., 2013), o que provavelmente ocorreu pela liberação controlada do tioconazol a partir das nanoestruturas. Além disso, sabe-se que o tioconazol possui afinidade pelo estrato córneo (CARRILLO-MUÑOZ et al., 2010). Em estudo conduzido por Sobue e Sekiguchi (2004), soluções tópicas de tioconazol, miconazol e bifonazol, todas contendo a mesma concentração de fármaco (1%) foram avaliadas em relação à absorção percutânea e distribuição dos fármacos nas diferentes camadas da pele. Os autores concluíram que dentre os fármacos testados, o tioconazol foi o que apresentou concentrações superiores no estrato córneo e

também na epiderme. Outros estudos, comparando nanopartículas lipídicas e poliméricas em termos de penetração/permeação cutânea foram desenvolvidos. Imagens confocal demonstraram que as nanopartículas poliméricas promovem uma menor permeação cutânea de substâncias em relação à nanopartículas lipídicas (ABDEL-MOTTALEB; NEWMANN; LAMPRECHT, 2001). Os autores sugerem que as nanocápsulas poliméricas são consideradas mais adequadas quando se deseja o direcionamento a uma camada específica da pele. Em outro estudo comparativo entre nanopartículas poliméricas e lipídicas contendo óleo de copaíba, os autores verificaram uma maior retenção do fármaco no estrato córneo e na derme quando veiculados às nanocápsulas poliméricas, enquanto uma maior quantidade de fármaco foi verificada no meio receptor quando veiculado ao nanocarreadores lipídicos (VENTURINI et al., 2015).

O alcance da epiderme viável pelo fármaco parece estar relacionado com o surgimento das alergias de contato. É nesta camada que se encontram as células de Langerhans apresentadoras de antígenos, e estas encontram-se aumentadas em casos recorrentes de dermatites de contato (RAMOS-E-SILVA; CASTRO, 2010). Desse modo, o evidente direcionamento do tioconazol ao estrato córneo promovido pelas Mangoesferas e TIO-R-NC<sub>COPA</sub>, com mínima incidência na epiderme viável, além de concentrar o antifúngico ao sítio de instalação dos fungos, evita o surgimento das alergias de contato comumente relatadas para o fármaco. Assim, estes hidrogéis atuariam como reservatórios, prolongando o tempo de permanência do tioconazol na pele e reduzindo a ocorrência dos efeitos adversos. Estudos estão em andamento para verificar a atividade antifúngica *in vivo* dos hidrogéis em modelo de infecção em camundongos.

Dentre as micoses superficiais encontram-se as onicomicoses, que envolvem predominantemente a instalação e o desenvolvimento de fungos dermatófitos ou algumas leveduras nas unhas. Estes casos mais específicos de micoses superficiais, frequentemente tornam-se situações crônicas devido à baixa taxa de cura e aos elevados índices de recorrência, causados pela não eliminação dos agentes etiológicos decorrente da carência de terapias adequadas. Diante do exposto, a segunda parte deste trabalho teve como foco o tratamento tópico das onicomicoses originando os capítulos 3 e 4. O capítulo 3 resultou em uma revisão da literatura sobre a utilização de óleos essenciais no tratamento tópico de onicomicoses. Já o capítulo 4 resultou no desenvolvimento de uma formulação específica para aplicação ungueal do tioconazol contendo nanocápsulas poliméricas com propriedades bioadesivas e a posterior avaliação da performance acerca da liberação ungueal do fármaco e da eficácia em modelo de onicomicose.

O tratamento tópico para onicomicoses constitui em uma alternativa à terapia sistêmica por apresentar menores incidências de efeitos adversos e interações medicamentosas (MURDAN, 2008). No entanto, é necessário o alcance do antifúngico ao local da infecção em concentrações efetivas (KAUR; KAKKAR, 2010), o que é dificultado pela baixa permeabilidade dos antifúngicos através da placa ungueal (MURTHY; MAIBACH, 2013). Além disso, é necessário que a substância ativa permaneça tempo suficiente para que possa penetrar na placa ungueal (REPKA; MIDIDODDI; STODGHILL, 2004). A penetração através da unha é fundamental, uma vez que agentes etiológicos se localizam entre as fibras de queratina ou entre o leito da unha e placa ungueal (BARAN; KAOUKHOV, 2005). Com o intuito de se obter uma formulação adequada à aplicação ungueal do tioconazol, e com boa performance em termos de penetração do fármaco em unhas, o presente capítulo foi delineado. Neste capítulo foram desenvolvidas nanocápsulas poliméricas de TCM, revestidas e não revestidas com quitosana e o posterior desenvolvimento de uma formulação ungueal líquida do tipo esmalte contendo as nanocápsulas revestidas. As formulações foram avaliadas em relação à retenção ungueal do tioconazol e à eficácia antifúngica em unhas humanas. Adicionalmente, foram realizadas microscopias confocais nas unhas após aplicação de formulações similares contendo um marcador lipofílico fluorescente, a fim de verificar a profundidade de penetração ungueal proporcionada pelos nanocarreadores.

As suspensões de nanocápsulas poliméricas, com e sem o revestimento catiônico foram preparadas da mesma forma que as nanocápsulas de copaíba, e denominadas TIO-NC e TIO-R-NC. As suspensões apresentaram aspecto homogêneo leitoso e reflexo azulado e a microscopia eletrônica de transmissão demonstrou o formato esférico e homogêneo das partículas. O tamanho de partículas apresentou-se na faixa nanométrica (155 nm TIO-NC e 162 nm para TIO-R-NC) com adequada homogeneidade indicada pelos baixos valores de polidispersão, corroborando com os resultados de microscopia. O potencial zeta apresentou-se negativo para TIO-NC e positivo para TIO-R-NC. O teor de tioconazol foi próximo ao teórico e a eficiência de encapsulamento de cerca de 100% para ambas formulações. O diâmetro de partículas apresentou-se ligeiramente menor em relação às nanocápsulas de copaíba, o que pode ser explicado pela natureza do núcleo oleoso. Todos os demais parâmetros avaliados estão de acordo com os verificados para as nanocápsulas de copaíba. Ribeiro e colaboradores (2016) obtiveram valores de 200 nm de diâmetro médio para nanocápsulas poliméricas utilizando os mesmos constituintes, com exceção do fosfolípideo, que no caso foi substituído por monoestearato de sorbitano. Venturini e colaboradores (2015) obtiveram diâmetros de partícula semelhantes aos encontrados por Ribeiro e colaboradores (2016), com uma partícula

semelhante, embora o núcleo oleoso fosse constituído de óleo de copaíba e monoestearato de sorbitano. A análise reológica das suspensões demonstrou valores superiores de viscosidade para as nanocápsulas revestidas com quitosana, da mesma forma que para as nanocápsulas de copaíba, corroborando com os resultados encontrados por Siqueira (2008). As formulações mantiveram-se estáveis por 30 dias. Quanto à localização do fármaco nas nanocápsulas segundo o algoritmo proposto por Oliveira e colaboradores (2013), da mesma forma que para as nanocápsulas de copaíba, para as nanocápsulas de TCM, o tioconazol encontra-se localizado majoritariamente no núcleo.

A atividade antifúngica das nanocápsulas foi verificada por difusão em ágar frente à *C. albicans*. As suspensões coloidais demonstraram-se igualmente ativas frente à esta levedura, da mesma forma que o fármaco em solução, demonstrando que o processo de obtenção das nanocápsulas não interferiu na atividade antifúngica do tioconazol, assim como foi reportado para as nanocápsulas de copaíba. Estes resultados foram previamente reportados por Ribeiro e colaboradores (2016) ao investigarem a influência do processo de secagem de nanocápsulas de TCM e tioconazol na atividade antifúngica do fármaco.

Devido às características mais adequadas das nanocápsulas revestidas com quitosana como maior viscosidade e bioadesividade (conferidas pelo revestimento com solução de quitosana), estas foram eleitas para o desenvolvimento das formulações ungueais. Estas formulações contam com a presença de um agente de consistência e um polímero formador de filme, no caso, o Pullulan. O Pullulan é um polissacarídeo de elevado peso molecular e alta solubilidade em água, capaz de formar filmes biodegradáveis na superfície de contato (DIONÍSIO et al., 2013), além de possuir capacidade bioadesiva (CHENG; DEMIRCI; CATCHMARK, 2011). As formulações ungueais (L-TIO-R-NC) apresentaram características organolépticas adequadas, de coloração branca e aspecto brilhante e homogêneo, com pH semelhante ao das TIO-R-NC e teor próximo ao teórico. A formulação ungueal demonstrou-se compatível com a incorporação das nanocápsulas, uma vez que as nanopartículas foram recuperadas após dispersão em água. Além disso, a avaliação das imagens de microscopia eletrônica de varredura da formulação ungueal após aplicação em unha humana, destaca a manutenção das nanocápsulas poliméricas revestidas, quando comparado à mesma micrografia da formulação ungueal base (sem as nanocápsulas).

Para avaliar a liberação do tioconazol a partir das nanocápsulas, foi utilizado como barreira os sacos de diálise, por ser uma barreira limitante para as nanopartículas, permitindo somente a passagem do fármaco para o meio de liberação, devido ao seu tamanho de poro de 12kDa (ANDRADE; FONTANA; BECK, 2014). Neste experimento, o meio de liberação

utilizado foi tampão fosfato a pH 7,4 adicionado de 0,5% de polissorbato 80, tendo em vista os futuros experimentos a serem realizados com as unhas. Ambas as formulações apresentaram perfis semelhantes de liberação, seguindo modelo bi-exponencial, liberando ao final de 72 h de experimento, cerca de 60 % do tioconazol total. A fim de comparar a liberação do tioconazol a partir das nanocápsulas de TCM e de óleo de copaíba, optou-se por repetir os experimentos para as nanocápsulas de TCM utilizando o mesmo meio de liberação utilizado para as nanocápsulas de copaíba, no qual se observou uma maior liberação para as nanocápsulas revestidas. Os resultados demonstraram um maior percentual de liberação do tioconazol a partir das nanocápsulas revestidas (90%) frente às não revestidas (50%) ao final de 30 h, sendo muito próximo aos valores obtidos para as nanocápsulas de copaíba. Ainda, pode-se inferir que a liberação do tioconazol foi influenciada pelo pH do meio, uma vez que para a avaliação da liberação a partir das nanocápsulas de TCM, dois meios de liberação foram utilizados, um tamponado a um pH neutro, e outro, uma solução hidroalcoólica. Cabe salientar que os resultados obtidos nos estudos de liberação corroboram com os estudos de distribuição do fármaco nas nanocápsulas.

Uma segunda bateria de experimentos foi realizada objetivando verificar se as suspensões de nanocápsulas e da formulação ungueal contendo as partículas revestidas eram capazes de manter o tioconazol solúvel, permitindo que transpusesse uma barreira hidrofóbica por longos períodos de tempo. Para isto, foi utilizada uma membrana de silicone, disposta em células de difusão do tipo Franz. Conforme os resultados, todas as formulações foram hábeis em permitir a permeação do tioconazol através desta barreira. Entretanto, diferenças entre as formulações foram verificadas. Para os dois tipos de nanocápsulas, a quantificação do fármaco no meio de liberação ocorreu de forma bi exponencial, e, ao final de 72 h, cerca de 50% do total de fármaco se encontrava no compartimento receptor para ambas. A avaliação das formulações ungueais demonstrou que todas permitiram a permeação do tioconazol através da membrana de silicone por períodos de tempo prolongados. Como esperado, devido ao controle de liberação proporcionado pelas nanocápsulas, a formulação L-TIO-R-NC apresentou um menor potencial de difusão do fármaco (30%) em 72 h em relação à formulação comercial (Trosid<sup>®</sup>) e a formulação ungueal com o fármaco não associado (L-TIO). Este fato reforça a manutenção da integridade das nanocápsulas após a incorporação nas formulações ungueais. Enquanto que as formulações sem as nanocápsulas, em que o fármaco se dispunha não associado, os perfis de difusão foram semelhantes, ambos permitindo que o dobro (60%) do tioconazol alcançasse o meio receptor já nas primeiras 34 h.

Após verificar a habilidade das formulações em manter o tioconazol solúvel, permitindo, assim, a transposição do mesmo através de uma barreira hidrofóbica por períodos de tempo prolongados, os estudos prosseguiram a fim de avaliar as formulações em relação à permeação/penetração em unhas humanas. Para esta avaliação, diferentes protocolos foram seguidos, utilizando aplicação única ou diária das formulações em unhas íntegras, e aplicação diária em unhas microporadas. Todos os experimentos foram conduzidos por 7 dias e ao final, o meio receptor foi analisado. Para todos os protocolos não foi possível quantificar o fármaco no meio receptor. Está bem estabelecida a função de barreira exercida pela unha, assim como sua impermeabilidade a substâncias lipofílicas e de elevado peso molecular (SHIVAKUMAR et al., 2013). Entretanto, é de grande valia o conhecimento da concentração alcançada pelo fármaco na unha após a aplicação, pois é ali que ele irá exercer o seu efeito fungistático/fungicida. Para todos os protocolos seguidos, as formulações desenvolvidas (TIO-NC, TIO-R-NC, L-TIO-R-NC) apresentaram concentrações superiores à concentração inibitória mínima (CIM) requerida para as diferentes cepas causadoras de onicomicoses. Em todos os protocolos, as nanocápsulas foram superiores à solução do fármaco, sendo que notavelmente, as nanocápsulas revestidas promoveram uma maior concentração de tioconazol retida nas unhas. No protocolo de aplicação única, a formulação ungueal apresentou a menor concentração de fármaco por grama de unha, o que pode ser explicado com os resultados da permeação em membrana de silicone, que demonstrou inferior percentual permeado. Entretanto, ao aplicar diariamente L-TIO-R-NC, concentrações semelhantes às obtidas para TIO-R-NC foram observadas. Isto evidencia que o protocolo de aplicação diária demonstrou ser mais adequado para avaliação das formulações. No último protocolo utilizado, com aplicação diária, a formulação comercial também foi avaliada e resultou em concentrações superiores. Estabelecendo uma relação entre a quantidade total aplicada durante 7 dias e a quantidade retida na unha ao final do experimento, calculou-se o percentual de recuperação do tioconazol, indicando a eficiência da formulação em termos de retenção ungueal de fármaco. Com os resultados obtidos fica evidente que o nanoencapsulamento do tioconazol propiciou uma maior recuperação do tioconazol em relação à quantidade aplicada. Ao comparar a formulação ungueal (L-TIO-R-NC) e a formulação comercial (Trosid<sup>®</sup>), a nova formulação apresentou um desempenho superior, demonstrando um percentual de recuperação cerca de 43 vezes maior. O resultado infere que uma concentração elevada de tioconazol (28%) presente na formulação comercial não está relacionada com a quantidade real quantificada na unha. Da mesma forma, quando a posologia indicada para o Trosid<sup>®</sup> foi seguida (aplicação 2 vezes ao dia) por 7 dias, novamente as novas formulações demonstraram

maiores percentuais de recuperação de tioconazol, mesmo sendo aplicadas uma vez ao dia. Ainda, a microporação cutânea tem sido estudada com o objetivo de melhorar a liberação de fármacos através da pele a partir da perfuração do estrato córneo (TUAN-MAHMOOD et al., 2013). Chiu e colaboradores (2015) constataram uma maior penetração do marcador fluorescente em unhas microporadas. Surpreendentemente, a microporação das unhas não acarretou à permeação do tioconazol através da unha, bem como não influenciou na concentração de fármaco retido.

Recentemente, a utilização da microscopia confocal de varredura a laser (MCVL) vem sendo utilizada nas pesquisas relacionadas à unha, a fim de estudar as características morfológicas (SATTLER et al., 2012) e o diagnóstico de onicomicoses (HONGCHARU et al., 2000). Estudos relacionados à liberação de substâncias na placa ungueal receberam atenção de Dutet e Delgado-Charro (2012) para investigar a influência da iontoforese na penetração dos marcadores fluorescentes, e de Chiu e colaboradores (2015) ao investigarem a penetração do marcador em unhas microporadas, utilizando nanopartículas poliméricas como possíveis vetores à penetração. A MCLV auxilia na visualização do marcador fluorescente na estrutura ungueal. Dessa forma, objetivando verificar a profundidade de penetração de uma substância lipofílica fluorescente a partir das formulações desenvolvidas, o marcador vermelho do Nilo substitui o tioconazol nas formulações. Não foram observadas diferenças entre as formulações em termos de profundidade de penetração, tampouco entre os protocolos utilizados e nas unhas microporadas. O marcador, a partir das formulações, penetrou a uma profundidade correspondente à mais 30% da espessura ungueal, o que corresponde a uma espessura superior à relatada para a primeira camada da unha, camada esta, a principal responsável pela impermeabilidade à substâncias. Dessa forma, a partir das formulações desenvolvidas, é possível ultrapassar a barreira à permeação. Em estudo conduzido por Chiu e colaboradores (2015), foi demonstrado que a permeação do marcador fluorescente na unha aumenta em função do tempo e que a presença de microporos aumentou a intensidade do marcador, desempenhando, assim, papel positivo na permeação. A penetração do marcador se deu via intercelular, independentemente da presença dos microporos, assim como observado no trabalho conduzido por Chiu e colaboradores (2015).

A CIM de um agente antifúngico normalmente é determinada em meios de cultura padronizados. No entanto, na presença da queratina, especialmente das unhas, a CIM tende a ser maior (MURDAN, 2013). Assim, seria interessante avaliar a atividade antifúngica de L-TIO-R-NC em um modelo de onicomicose, em que a infecção está presente na unha, estabelecendo uma comparação com a formulação comercial (Trosid®). Flores e

colaboradores (2013) realizaram, pela primeira vez, um estudo para avaliar a atividade antifúngica de sistemas nanoestruturados em modelo de onicomicose por *T. rubrum*. Assim, o estudo foi realizado seguindo a metodologia descrita por Flores e colaboradores (2013), entretanto, por se tratar de formulações com características adequadas para aplicação ungueal, as unhas foram dispostas de modo que a parte dorsal ficasse voltada para cima, para melhor aplicação das formulações com auxílio de pincel próprio. A eficácia da formulação ungueal demonstrou-se equivalente à eficácia da formulação comercial, mesmo dispondo de uma concentração 280 vezes menor, em prevenir a infecção na unha. Estudos prévios em relação à aplicação tópica de nanocápsulas sugerem um aumento na captação de substâncias ativas na pele (LBOUTOUNNE et al., 2002; TEIXEIRA et al., 2010). Além disso, o nanoencapsulamento de antifúngicos tem demonstrado aumento na atividade antifúngica dos mesmos (LBOUTOUNNE et al., 2002; YADAV; AHUJA, 2010; BHATTA et al., 2012). Flores e colaboradores (2013) verificaram superioridade na performance do óleo de melaleuca quando nanoencapsulado, em relação ao óleo não associado, em modelo de onicomicose *in vitro*. A nanotecnologia favorece a ação antimicrobiana de substâncias, muitas vezes aumentando a atividade, principalmente devido ao seu tamanho submicrométrico. O reduzido tamanho de partícula reduz o ângulo de contato com a superfície do microorganismo, permitindo que um maior número de partículas contendo o fármaco entre em contato, resultando em uma maior exposição do antimicrobiano à célula infecciosa (PADMAVATHY; VIJAYARAGHAVAN, 2008). Além disso, o controle de liberação de fármacos proporciona uma difusão contínua para a membrana, aumentando a permeabilidade através da membrana microbiana (LBOUTOUNNE et al., 2002).

O teste da membrana córneo-alantóide é considerado um teste alternativo aos testes de irritação conduzidos em coelhos, apresentando alta sensibilidade e a possibilidade de discernimento entre substâncias irritantes e não irritantes (SPIELMAN, 1997). Dessa forma, o ensaio foi conduzido a fim de avaliar o potencial irritante das formulações dado o conhecido potencial irritante do tioconazol. Os resultados do ensaio demonstram a redução do potencial irritante do tioconazol quando este estava veiculado às nanocápsulas poliméricas, em comparação com a mesma concentração do fármaco em solução hidroalcoólica. Estes resultados corroboram com os encontrados na avaliação das nanocápsulas contendo o óleo de copaíba. Ainda, a formulação ungueal e a formulação comercial do tioconazol para unhas foram avaliadas. A formulação ungueal (L-TIO-R-NC) foi classificada como ligeiramente irritante, ao passo que a comercial foi classificada como irritante. Esperava-se que a comercial

apresentasse maior potencial de irritabilidade, tendo em vista a maior concentração de fármaco utilizada.

O desenvolvimento da formulação ungueal hidrofílica proposta no presente capítulo, possibilitou a redução de concentração do tioconazol, com atividade antifúngica equivalente à apresentada pela formulação comercial e menor potencial irritante, constituindo uma plataforma promissora no tratamento e na prevenção de reinfecções fúngicas ungueais. Cabe salientar o ineditismo da formulação ungueal, não sendo encontrados nas bases de dados disponíveis estudos tecnológicos de permeação e atividade biológica para esta nova formulação. Além disso, o estudo proporcionou resgatar um fármaco antigo, para o qual poucos estudos a cerca do desenvolvimento de novas formulações encontram-se descritos na literatura.

**CONCLUSÕES**

---



#### 4 CONCLUSÃO

- Neste trabalho foi verificada a viabilidade de obtenção de nanopartículas lipídicas sólidas e carreadores lipídicos nanoestruturados contendo tioconazol, as Mangoesferas, utilizando a manteiga de manga como lipídeo sólido e o óleo de melaleuca como lipídeo líquido. As Mangoesferas apresentaram características físico-químicas satisfatórias, controle de liberação do fármaco e atividade antifúngica. Os hidrogéis contendo tais estruturas apresentaram características adequadas para aplicação cutânea e proporcionaram retenção do tioconazol ao estrato córneo, sítio de instalação de desenvolvimento dos fungos dermatófitos.
- A obtenção de nanocápsulas poliméricas de óleo de copaíba e tioconazol demonstrou-se viável tecnologicamente, assim como o revestimento com o polímero catiônico quitosana. As nanocápsulas apresentaram características físico-químicas adequadas, controle de liberação do tioconazol e atividade antifúngica *in vitro*. As nanocápsulas revestidas apresentaram características bioadesivas e maior estabilidade frente ao armazenamento. Os hidrogéis obtidos a partir das nanocápsulas apresentaram características adequadas e compatíveis com aplicação cutânea. Os hidrogéis contendo as nanocápsulas revestidas demonstraram características bioadesivas e superior retenção do tioconazol no estrato córneo.
- Nanocápsulas de TCM e o seu revestimento com quitosana foram desenvolvidas para a liberação ungueal de tioconazol. As suspensões coloidais apresentaram características físico-químicas satisfatórias, controle de liberação do tioconazol, atividade antifúngica *in vitro* e estabilidade. As nanocápsulas revestidas com quitosana demonstraram superioridade em relação à retenção de fármaco na unha. Os estudos de microscopia confocal demonstraram que as formulações foram aptas em liberar o marcador lipofílico fluorescente nas unhas em uma profundidade de cerca de 30% da espessura total da unha.
- As formulações ungueais apresentaram características físico-químicas adequadas, compatibilidade com as nanocápsulas e superior performance nos estudos de penetração/retenção ungueal quando comparado à formulação comercial Trosid<sup>®</sup>. A formulação ungueal desenvolvida demonstrou-se equivalente ao Trosid<sup>®</sup> ao impedir a infecção em modelo de infecção ungueal causada pelo *Trichophyton rubrum*, com redução de 280 vezes na concentração do fármaco.

- As nancápsulas poliméricas de óleo de copaíba e de TCM reduziram o potencial irritante do tioconazol e as formulações ungueais demonstraram menor potencial irritante em relação ao Trosid<sup>®</sup>.
- As formulações dermatológicas (hidrogéis) e a formulação ungueal contendo o tioconazol associado às nanoestruturas, desenvolvidas neste trabalho, demonstraram superioridade em relação às formulações contendo o tioconazol não associado, demonstrando-se promissoras para o tratamento tópico de micoses superficiais de pele e unhas, respectivamente.

## **REFERÊNCIAS**

---



## REFERÊNCIAS

- ABDEL-MOTTALEB, M. A.; NEWMANN, D.; LAMPRECHT, A. L. F. Lipid nanocapsules for dermal application: A comparative study of lipid based versus polymer based nanocarriers. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 79, p. 36–42, 2011.
- AHMAD, Z. et al. Novel chemotherapy for tuberculosis: chemotherapeutic potential of econazole- and moxifloxacin-loaded PLG nanoparticles. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 31, p. 142-146, 2008.
- ALBERT, S. F.; WEIS, Z. H. Management of onychomycosis with topical. **Clinics in Podiatric Medicine and Surgery**, v. 21, p. 605-615, 2004.
- ALVAREZ-ROMÁN et al. Biodegradable polymer nanocapsules containing a sunscreen agent:preparation and photoprotection. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 52, p. 191-195, 2001.
- ALVES, M. P. **Formas farmacêuticas plásticas contendo nanocápsulas, nanoesferas e nanoemulsões de nimesulida: desenvolvimento, caracterização e avaliação da permeação cutânea in vitro**. 2006. 183 p. Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas)- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2006.
- ALVES, M. P. et al. Human skin penetration and distribution of nimesulide from hydrophilic gels containing nanocarriers. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 341, p. 215-220, 2007.
- ALVES, M. P.; POHLMANN, A. R.; GUTERRES, S.S.; Semisolid topical formulations containing nimesulide-loaded nanocapsules, nanospheres or nanoemulsion: development and rheological characterization. **Pharmazie**, n. 60, p. 900-904, 2005.
- AMARAL, A. et al. Amphotericin B in poly(lactic-co-glycolic acid) (PLGA) and dimercaptosuccinic acid (DMSA) nanoparticles against paracoccidioidomycosis. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 63, p. 526-533, 2009.
- ANDRADE, D. F.; FONTANA, M. C.; BECK, R. C. R. In vitro drug release studies from semisolid dosage forms containing polymeric nanocapsules: the choice of suitable synthetic membrane  
Current Nanoscience, v. 10, p. 367-373, 2014
- ANTON, N.; BENOIT, J-P.; SAULNIER, P. Design and production of nanoparticles formulated from nano-emulsion templates - A review. **Journal of Controlled Release**, v. 128, p. 185-199, 2008.
- ATTAMA, A. A. et al. A new Lipid Based Drug Delivery System (LBDDS) for oral delivery of tioconazole. **International Journal of Drug Delivery**, v.3, p. 743-753, 2011.
- BAKKALI, F.; AVERBECK, D.; IDAOMAR, M. Biological effects of essential oils-A review. **Food and Chemical Toxicology**, v. 46, p. 446-475, 2008.

- BANERJEE, R. Overcoming the stratum corneum barrier: a nano approach **Drug Delivery and Translational Research**, v. 3, p. 205–208, 2013.
- BARAN, R.; KAOUKHOV, A. Topical antifungal drugs for the treatment of onychomycosis: an overview of current strategies for monotherapy and combination therapy. **Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology**, v. 19, p. 21-29, 2005.
- BATHEJA, P. et al. Topical drug delivery by a polymeric nanosphere gel: Formulation optimization and in vitro and in vivo skin distribution studies. **Journal of Controlled Release**, v. 149, p. 159–167, 2011.
- BECK, R. C. R.; GUTERRES, S. S.; POHLMANN, A. R. **Nanocosmetics and Nanomedicines: New Approaches for skin care**. Ed. Springer, 2011.
- BEGGS, W. H. Fungicidal activity of tioconazole in relation to growth phase of *Candida albicans* and *Candida parapsilosis*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, p. 699-701, 1984.
- BHALEKAR, M. R. et al. Preparation and evaluation of miconazole nitrate-loaded solid lipid nanoparticles for topical delivery. **AAPS PharmSciTech**, v. 10, n. 1, p. 289-296, 2009.
- BHATTA, R. S. et al. Mucoadhesive nanoparticles for prolonged ocular delivery of natamycin: In vitro and pharmacokinetics studies. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 432, p. 105-112, 2012.
- BRENNAN, B.; LEYDEN, J. J. Overview of topical therapy for common superficial fungal infections and the role of new topical agents. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 36, p. 3-8, 1997.
- BUCK, S. D.; NIDORF, D. M.; ADDINO, J., G. Comparison of two topical preparations for the treatment of onychomycosis: *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil and clotrimazole. **Journal of Family Practice**, v. 38, n. 6, p. 601-605, 1994.
- BURT, S. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods- a review. **International Journal of Food Microbiology**, v. 94, p. 223-253, 2004.
- CALVO, P.; VILA-JATO, J. L.; ALONSO, M. J. Evaluation of cationic polymer-coated nanocapsules as ocular drug carriers. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 153, p. 41–50, 1997.
- CAMPOS, A. M.; SÁNCHEZ, A.; ALONSO, M. J. Chitosan nanoparticles: a new vehicle for the improvement of the delivery of drugs to the ocular surface. Application to cyclosporin A. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 224, 159–168, 2001
- CAMPOS, A. M.; SANCHEZ A.; GREF, P.; CALVO, P.; ALONSO, M. J. The effect of a PEG versus a chitosan coating on the interaction of drug colloidal carriers with the ocular mucosa. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 20, p. 73–81, 2003.

- CARRILLO-MUÑOZ, A. J.; TUR-TUR, C.; HERNÁNDEZ-MOLINA, J. M.; SANTOS, P.; CÁRDENAS D.; GIUSIANO G. Antifúngicos disponibles para el tratamiento de las micosis ungueales. **Revista Iberoamericana de Micología**, v. 27, p. 49-56, 2010.
- CARSON, C. F.; ASHTON, L.; DRY, L.; SMITH, D. W.; RILEY, T. V. Melaleuca alternifolia (tea tree) oil gel (6%) for the treatment of recurrent herpes labialis. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, v. 48, p. 450-451, 2001.
- CARSON, C. F.; HAMMER, K. A.; RILEY, T. V. *Melaleuca alternifolia* (Tea Tree) oil: a review of antimicrobial and other medicinal properties. **Clinical Microbiology Reviews**, v.19, n.1, p. 50-62, 2006.
- CARSON, C. F.; RILEY, T. V. Antimicrobial activity of the major components of the essential oil of *Melaleuca alternifolia*. *Journal of Applied Microbiology*, v. 78, p. 264-269, 1995.
- CATTANI, V. B. et al. Lipid-core nanocapsules restrained the indomethacin ethyl ester hydrolysis in the gastrointestinal lumen and wall acting as mucoadhesive reservoirs. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 39, p. 116–124, 2010.
- CELIA, C.; TRAPASSO, E.; COSCO, D.; PAOLINO, D.; FRESTA, M. Turbiscan Lab® Expert analysis of the stability of ethosomes® and ultradeformable liposomes containing a bilayer fluidizing agent. **Colloids and Surfaces B**, v. 72, p. 155-160, 2009.
- CEVC, G.; VIERL, U. Nanotechnology and the transdermal route. A state of the art review and critical appraisal. **Journal of Controlled Release**, v. 141, p. 277–299, 2010.
- CHAWLA, V.; SARAF, S. A. Rheological studies on solid lipid nanoparticle based carbopol gels of aceclofenac. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 92, p. 293–298, 2012.
- CHENG, K.C.; DEMIRCI, A.; CATCHMARK, J.M. Pullulan: biosynthesis, production, and applications. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 92, p. 29–44, 2011.
- CHIU, W. S. et al. Drug delivery into a microneedle-porated nails from nanoparticles reservoirs. **Journal of Controlled Release**, v. 220, p. 98-106, 2015.
- CHOUHAN, R.; BAJPAI, A. K. Release dynamics of ciprofloxacin from swellable nanocarriers of poly(2-hydroxyethyl methacrylate): an in vitro study. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine**, v. 6, p. 453–462, 2010.
- COELHO, L. M. et al. *In vitro* antifungal drug susceptibilities of dermatophytes microconidia and arthroconidia. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 62, p. 758–761, 2008.
- COLOMÉ, L. M. et al. Theospheres based on *Theobroma grandiflorum* seed butter: development of innovative nanoparticles for skin application. **Soft Materials**, v.8, n. 2, 72-88, 2010.
- CONTRI, R. et al. Simultaneous control of capsaicinoids release from polymeric nanocapsules. **Journal of Nanoscience and Nanotechnology**, v. 11, p. 2398–2406, 2011.

CRYER, J. R.; ROBINSON, C. J. In vitro study to establish the efficacy of 28% tioconazole solution (Trosyl) against *Trichophyton rubrum* and *Candida albicans*. **The Foot**, v. 7, p. 27-29, 1997.

DALLARMI, L.; MIGUEL, M. D.; CANSIAN, F. C. Comparative sensory evaluation of dermoformulação containing butter mango (*Mangifera indica*). **Visão Acadêmica**, Curitiba, v.13, n.1, 2012.

DAS, S.; KIONG, W.; TAN, R. B. H. Are nanostructured lipid carriers (NLCs) better than solid lipid nanoparticles (SLNs): Development, characterizations and comparative evaluations of clotrimazole-loaded SLNs and NLCs? **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 47, p. 139–151, 2012.

DETONI, C. B. et al. Photostability and skin penetration of different e-resveratrol-loaded supramolecular structures. **Photochemistry and Photobiology**, v. 88, n. 4, p.913-921, 2012.

DIONÍSIO, M.; CORDEIRO, C.; REMUÑÁN-LÓPEZ, C.; SEIJO, B.; DA COSTA, A.M.R.; GREHA, A. Pullulan-based nanoparticles as carriers for transmucosal protein delivery. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 50, p. 102-113, 2013.

DILLEN, K. et al. Evaluation of ciprofloxacin-loaded EudragitR RS100 or RL100/PLGA nanoparticles. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 314, p. 72–82, 2006.

DODANE, V.; KHAN, M. A.; MERWIN, J. R. Effect of chitosan on epithelial permeability and structure. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 182, p. 21-32, 1999.

DOOMS-GOOSSENS, A. et al. Contact allergy to imidazoles used as antimycotic agents. **Contact Dermatitis**, v. 33, p. 73-77, 1995.

DRAKE, L. A. et al. **Journal of American Academy of Dermatology**, v. 34, p. 116-121, 1996.

DRAKE, L. A. et al. The impact of onychomycosis on quality of life: Development of an international onychomycosis-specific questionnaire to measure patient quality of life. **Journal of American Academy of Dermatology**, v. 41, p. 189-96, 1999.

DUTET, J.; DELGADO-CHARRO, M. B. Assessment of Iontophoretic and Passive Ungual Penetration by Laser Scanning Confocal Microscopy. **Pharmaceutical Research**, v. 29, p. 3464-3474, 2012.

EFFENDY, I. et al. Epidemiology and clinical classification of onychomycosis. **Journal of European Academy of Dermatology and Venereology**, v. 19, n. 1, p. 8–12, 2005.

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

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

ELZATAHRY, A. A.; ELDIN, M. S. M. Preparation and characterization of metronidazole loaded chitosan nanoparticles for drug delivery application. **Polymers Advanced Technologies**, v. 19, p. 1787–1791, 2008.

ESPUELAS, M. S. et al. Poly( $\epsilon$ -caprolacton) nanospheres as an alternative way to reduce amphotericin B toxicity. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 158, p. 19–27, 1997.

ETHERIDGE, M. L.; CAMPBELL, S. A.; ERDMAN, A.G.; HAYNES, C. L.; WOLF, S. M.; McCULLOUGH, J. The big picture of nanomedicine: the state of investigational and approved nanomedicine products. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine**, v. 9, p. 1–14, 2013.

EVANS; ROBERTS. Subungual dermatophytoma complicating dermatophyte onychomycosis. **British Journal of Dermatology**, v. 138, n. 1, p. 189–190, 1998.

FDA. Food and Drug Administration, United States of America, 2013. 21 CFR 172.510.

FINCH, J. F.; WARSHAW, R. M. Toenail onychomycosis: current and future treatment options. **Dermatologic Therapy**, v. 20, p. 31–46, 2007.

FISHER, D.; AHLEMEYER, Y. L. B.; KRIEGISTEIN, J.; KISSEL, T. In vitro cytotoxicity testing of polycations: influence of polymer structure on cell viability and hemolysis **Biomaterials**, v. 24, p. 1121–1131, 2003

FLORES, F. C. et al. Hydrogels containing nanocapsules and nanoemulsions of tea tree oil provide anti-inflammatory effect and improved skin wound healing. **Journal of Nanoscience and Nanotechnology**, v. 14, p. 1–10, 2014.

FLORES, F. C. et al. Nanostructured systems containing an essential oil: protection against volatilization. **Quimica Nova**, v. 34, p. 968–972, 2011.

FLORES, F. C. et al. Antifungal activity of nanocapsule suspensions containing tea tree oil on the growth of *Trichophyton rubrum*. **Mycopathologia**, v. 175, p. 281–286, 2013.

FLORES, F. C.; RIBEIRO, R. F.; SILVA, C. B. Antifungal activity of nanocarriers containing tea tree oil on the growth of *C. albicans*: an inhibition profile study. **Ciência e Natura**, v. 37, 1–6, 2015.

FONTANA, M. C. et al. Nanoencapsulation as a way to control the release and to increase the photostability of clobetasol propionate: Influence of the Nanostructured System. **Journal of Biomedical Nanotechnology**, v.5, p. 1–10, 2009.

FONTANA, M. C. et al. Improved efficacy in the treatment of contact dermatitis in rats by a dermatological nanomedicine containing clobetasol propionate. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 79, p. 241–249, 2011.

FREDRIKSSON, T. Treatment of dermatomycoses with topical tioconazole and miconazole. **Dermatologica**, v.166:14–19, 1983.

- FONSECA, F. N. et al. Mucoadhesive Amphiphilic Methacrylic Copolymer-Functionalized Poly ( $\epsilon$ -caprolactone) Nanocapsules for Nose-to-Brain Delivery of Olanzapine. **Journal of Biomedical Nanotechnology**, v. 11, p. 1-10, 2014.
- FROMTLING, R. A. Overview of medically important antifungal azole derivatives. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 1, p. 187–217, 1988.
- FUKUI, H. et al. A novel delivery system for amphotericin B with lipid nano-sphere (LNS®). **International Journal of Pharmaceutics**, v. 265, p. 37–45, 2003.
- GAMBHIRE, M. S.; BHALEKAR, M. R.; SHRIVASTAVA, B. Investigations in photostability of dithranol incorporated in solid lipid nanoparticles. **Pharmaceutical Chemistry Journal**, v. 46, n. 4, 2012.
- GARG, A.; AGGARWAL, D.; GARG, S.; SINGLA, A. Spreading of semisolid formulations. **Pharmaceutical Technology**, v. 26, p. 84-105, 2002.
- GARG, J. et al. Rapid detection of dermatophytes from skin and hair. **BioMedicalCenter Research Notes**, v. 2, n.60, p. 1-6, 2009.
- GAROZZO, A. et al. In vitro activity of Melaleuca alternifolia essential oil. **Letters in Applied Microbiology**, v. 49, p. 806-808, 2009.
- GAYDOU, E. M. Sterols, methyl sterols, triterpene alcohols and fatty acids of the kernel fat of different malagasy mango (*Mangifera indica*) Varieties **JAOCs**, v. 61, n. 10, p. 1589-1593, 1984.
- GOMES, N. M. et al. Antinociceptive activity of Amazonian Copaiba oils. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 109, p. 486–492, 2007.
- GOODMAN; GILMAN: As bases farmacológicas da terapêutica, Rio de Janeiro: McGraw-Hill Interamericana do Brasil, 2006, 11 edição.
- GROVER, C.; KHURANA, A. An update on treatment of onychomycosis. **Mycoses**, v. 55, p. 541- 551, 2012.
- GUIN, J.; KINCANNON, J. Medication-induced contact reactions. **Clinics in Dermatology**, v. 15, p. 511-525, 1997.
- GUNT, H.; KASTING, G. B. Effect of hydration on the permeation of ketonazole through human nail plate *in vitro*. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 32, p. 254-260, 2007.
- GUPTA, H. et al. Sparfloxacin-loaded PLGA nanoparticles for sustained ocular drug delivery. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine**, v. 6, p. 324–333, 2010.
- GUPTA, A.; SCHER, R. K.; DONCKER, P. Current management of onychomycosis: An overview. **Advances in Clinical Research**, v. 15, n. 1, p. 121-135, 1997.

GUPTA, A. K.; CHAUDHRY, M.; ELEWSKI, B. Tinea corporis, tinea cruris, tinea nigra, and piedra. **Dermatologic Clinics**, v. 21, p. 395-400, 2003.

GUPTA, A. K.; TU, L. Q. Therapies for onychomycosis: A review. **Dermatologic Clinics**, v. 24, p. 375–379, 2006.

GUPTA, M.; VYAS, S. P. Development, characterization and in vivo assessment of effective lipidic nanoparticles for dermal delivery of fluconazole against cutaneous candidiasis. **Chemistry and Physics of Lipids**, v. 165, p. 454– 461, 2012.

GUPTA, H.; AQIL, M.; KHAR, R. K.; ALI, A.; BHATNAGAR, A.; MITTAL, G. V. Biodegradable levofloxacin nanoparticles for sustained ocular drug delivery. pages. **Journal of Drug Targeting**, v. 19, p. 409-417, 2011

GUTERRES, S. S.; ALVES, M. P.; POHLMANN, A. R. Polymeric nanoparticles, nanospheres and nanocapsules, for cutaneous applications. **Drug Target Insights**, v. 2, p. 147-157, 2007.

HADJI-MINAGLOU, F.; BOLCATO, O. The potential role of specific essential oils in the replacement of dermacorticoid drugs (strong, medium and weak) in the treatment of acute dry or weeping dermatitis. **International Journal of Aromatherapy**, v. 15, p. 66-73, 2005.

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

HAMIDI, M.; AZADI, A.; RAFIEI. Hydrogel nanoparticles in drug delivery. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 60, p. 1638-1649, 2008.

HAMMER, K. A.; CARSON, C.F.; RILEY. Antifungal activity of the components of *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil. **Journal of Applied Microbiology**, v. 95, p. 853-860, 2003.

HAN, F. et al. Nanostructured lipid carriers (NLC) based topical gel of flurbiprofen: Design, characterization and in vivo evaluation. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 439, p. 349– 357, 2012.

HART, P. H. et al. Terpinen-4-ol, the main component of the essential oil of *Melaleuca alternifolia* (tea tree oil), suppresses inflammatory mediator production by activated human monocytes. **Inflammation Research**, v. 49, p. 619-626, 2000.

HÄRTER, A. P. G. **Desenvolvimento de nanoemulsões e nanocápsulas poliméricas contendo tioconazol e incorporação em hidrogéis**. 2013, 127 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas)- Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS, 2013.

HÄRTER, A. P. G. et al. Development of a method for determination of tioconazole associated with polymeric nanocapsules by liquid chromatography. **Química Nova**, v. 37, p. 996-999, 2014.

HAY, R. J.; BARAN, R. Onychomycosis: A proposed revision of the clinical classification. **Journal of American Academy of Dermatology**, v. 65, p. 1219-1227, 2011.

- HAY, R. J.; MACKIE, R. M.; CLAYTON, Y. M. 1985. Tioconazole nail solution-an open study of its efficacy in onychomycosis. **Clinical and Experimental Dermatology**, v. 10, p.111-115, 1985.
- HEIKKILA, H.; STUBB, S.; REITAMO, S. A study of 72 patients with contact allergy to tioconazole. **British Journal of Dermatology**, v. 134, p. 678-680, 1996.
- HENDERSON, J. T. et al. Tioconazole in the treatment of vaginal candidiasis. **Gynäkologisch-geburtshilfliche Rundschau**, v. 23, p. 42-60, 1983.
- HONGCHARU, W.; DWYER, P.; GONZALEZ, S.; ANDERSON, R. R. Confirmation of onychomycosis by in vivo confocal microscopy. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 42, p. 214-216, 2000.
- HOUANG, E.; LAWRENCE, A. G. Systemic Absorption and Persistence of Tioconazole in Vaginal Fluid after Insertion of a Single 300-mg Tioconazole Ovule. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, p. 964-965, 1985.
- HOW, C. W.; RASEDEE, A.; ABBASALIPOURKABIR, R. Characterization and cytotoxicity of nanostructured lipid Carriers Formulated With Olive Oil, Hydrogenated Palm Oil, and Polysorbate 80. **IEEE Transactions on Nanobioscience**, v. 12, n. 2, p. 72-78, 2013.
- HUANG, D. B. et al. Therapy of common superficial fungal infections. **Dermatologic Therapy**, v. 17, p. 517-522, 2004.
- HUH, A. J.; KWON, Y. J. "Nanoantibiotics": A new paradigm for treating infectious diseases using nanomaterials in the antibiotics resistant era. **Journal of Controlled Release**, v. 156, n. 2, p. 128-145, 2011.
- HUYNH, N.T. et al. Lipid nanocapsules: A new platform for nanomedicine. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 379, p. 201-209, 2009.
- JÄGER, E. et al. Sustained release from lipid-core nanocapsules by varying the core viscosity and the particle surface area. **Journal of Biomedical Nanotechnology**, v. 5, p. 130-140, 2009.
- JAYATILAKE, J. A. M. S.; TILAKARATNE, W. M.; PANAGODA, G. J. Candidal onychomycosis: A Mini-Review. **Mycopathologia**, v. 168, p. 165-173, 2009.
- JEPPS, O. G.; DANCİK, Y.; ANISSIMOV, Y. G.; ROBERTS, M. S. Modeling the human skin barrier-Towards a better understanding of dermal absorption. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 65, p. 152-168, 2013.
- JERVONS, S. et al. Antifungal activity of tioconazole (UK-20,349), a new imidazole derivative. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 5, p. 597-602, 1979.
- JONES, R. N. et al. *In vitro* antimicrobial activity of tioconazole and its concentrations in vaginal fluids following topical (Vagistat-1 6.5%) application. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 17, p. 45-51, 1993.

JOSHI, M.; PATRAVALE, V. Nanostructured lipid carrier (NLC) based gel of celecoxib. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 346, p. 124–132, 2008.

KABUKI, T. et al. Characterization of novel antimicrobial compounds from mango (*Mangifera indica* L.) kernel seeds. **Food Chemistry**, v. 71, p. 61- 66, 2000.

KAMIYA, S. et al. Physical properties of griseofulvin-lipid nanoparticles in suspension and their novel interaction mechanism with saccharide during freeze-drying. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 74, p. 461–466, 2010.

KANBE, T. Molecular Approaches in the Diagnosis of Dermatophytosis. **Mycopathologia**, v. 166, p. 307-317, 2008.

KAUR, K. et al. Regulations in Nanotechnology: A Brief Review. **Journal of Pharmacy Research**, v. 3, n. 9, p. 2083-2087, 2010.

KAUR, I. P.; KAKKAR, S. Topical delivery of antifungal agents. **Expert Opinion in Drug Delivery**, p. 1-25, 2010.

KIM, M-K, et al. Evaluation of gender difference in skin type and pH. **Journal of Dermatological Science**, v. 41, p. 153-156, 2006.

KIM, J.-K.; PARK, J.-S.; KIM, C.-K. Development of a binary lipid nanoparticles formulation of itraconazole for parenteral administration and controlled release. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 383, p. 209–215, 2010.

KOBAYASHI, Y. et al. *In vitro* permeation of several drugs through the human nail plate: relationship between physicochemical properties and nail permeability of drugs. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 21, p. 471-477, 2004.

KUMAR, S.; RANDHAWA, J. K. High melting lipid based approach for drug delivery: Solid lipid nanoparticles. **Materials Science and Engineering C**, v. 33, p. 1842–1852, 2013.

LACAZ, C. S. et al. Tratado de micologia médica- São Paulo, **Editora Sarvier**, 2002.

LBOUTOUNNE, H. et al. Sustained ex vivo skin antiseptic activity of chlorhexidine in poly( $\epsilon$ -caprolactone) nanocapsule encapsulated form and as a digluconate. **Journal of Controlled Release**, v. 82, p. 319–334, 2002.

LEE, C. H.; MOTURI, V.; LEE, Y. Thixotropic property in pharmaceutical formulations. **Journal of Controlled Release**, v. 136, p. 88-98, 2009.

LESHER JR., J. L. Recent Developments in Antifungal Therapy. **Dermatologic Clinics**, v. 14, n. 1, p. 163-169, 1996.

LIMA, J. A. **Desenvolvimento de hidrogéis mucoadesivos contendo nanocápsulas catiônicas de clotrimazol para o tratamento da candidíase vulvovaginal**. 87p. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2015.

LOCH-NECKEL, G. et al. Orally Administered Chitosan-Coated Polycaprolactone Nanoparticles Containing Curcumin Attenuate Metastatic Melanoma in the Lungs. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 104, p. 3524–3534, 2015.

LUENGO, J. et al. Influence of nanoencapsulation on human skin transport of flufenamic acid. *Skin Pharmacology and Physiology*, v. 19, n. 4, p. 190- 197, 2006.

MAISUTHISAKUL, P. A.; GORDON, M. H. Antioxidant and tyrosinase inhibitory activity of mango seed kernel by product. **Food Chemistry**, v. 117, p. 332–341, 2009.

MANDAWGADE, S. D.; PATRAVALE, V. B. Formulation and evaluation of exotic fat based cosmeceuticals for skin repair. **Indian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v.70, p.539-542, 2008 a.

MANDAWGADE, S. D.; PATRAVALE, V. B. Development of SLNs from natural lipids: Application to topical delivery of tretinoin. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 363, p. 132–138, 2008 b.

MARCHIORI, M. L. et al. Hydrogel containing dexamethasone-loaded nanocapsules for cutaneous administration: preparation, characterization, and in vitro drug release study. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, v. 36, n.8, p. 962–971, 2011.

MERISKO-LIVERSIDGE, E., LIVERSIDGE, G. G., COOPER, E. R. Nanosizing: a formulation approach for poorly-water-soluble compounds. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v.18, p. 113-120, 2003.

MARTINEZ-ROSSI, N. M.; PERES, N. T. A.; ROSSI, A. Antifungal resistance mechanisms in dermatophytes. **Mycopathologia**, v. 166, p. 369–383, 2008.

MIASAKI, S.; TAKAHASHI, A.; KUBO, W.; BACHYNSKY, J.; LÖBENBERG, R. Poly n-butylcyanoacrylate (PNBCA) nanocapsules as a carrier for NSAIDs: *In vitro* release and *in vivo* skin penetration. **Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**, v. 6, p. 2040-2045, 2003.

MIGNON, B. et al. Immunization and dermatophytes. **Current Opinion in Infectious Diseases**, v. 21, p. 134–140, 2008.

MILÃO, D. et al. Hydrophilic gel containing nanocapsules of diclofenac: development, stability study and physico-chemical characterization. **Pharmazie**, v. 58, p. 325-329, 2003.

MILLIKAN, L. E. Current concepts in systemic and topical therapy for superficial mycosis. **Clinics in Dermatology**, v. 28, p. 212-216, 2010.

MISHRA, B. et al. Colloidal nanocarriers: a review on formulation technology, types and applications toward targeted drug delivery. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine**, v. 6, p. 9–24, 2010.

MODDARESI, M. et al. The role of vehicle–nanoparticle interactions in topical drug delivery. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 400, p. 176–182, 2010.

- MOHAMMADI, G. et al. Physicochemical and anti-bacterial performance characterization of clarithromycin nanoparticles as colloidal drug delivery system. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 88, p. 39–44, 2011.
- MOHARRAM, Y. G.; MOUSTAFA, R. A. M. Utilisation of mango seed kernel (*mangifera indica*) as a source of oil. **Food Chemistry**, v. 8, p. 269-276, 1982.
- MONTI, D. et al. *In vitro* transungual permeation of ciclopirox from a hidroxypropyl chitosan-based, water-soluble nail lacquer. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, v. 1, p. 11-17, 2005.
- MONTI, D. et al. Hydrosoluble medicated nail lacquers: in vitro drug permeation and corresponding antimycotic activity. **British Journal of Dermatology**, v. 162, p. 311-317, 2010.
- MÜLLER, R. H. et al. Oral bioavailability of cyclosporine: Solid lipid nanoparticles (SLN<sup>®</sup>) versus drug nanocrystals. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 317, p. 82–89, 2006.
- MÜLLER, R. H. et al. Nanostructured lipid carriers (NLC) in cosmetic dermal products. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 59, p. 522–530, 2007.
- MÜLLER, R. H. et al. Cyclosporine-loaded solid lipid nanoparticles (SLN): Drug–lipid physicochemical interactions and characterization of drug incorporation. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 68, p. 535–544, 2008.
- MÜLLER, R. H.; MÄDER, K.; GOHLA, S. Solid lipid nanoparticles (SLN) for controlled drug delivery - a review of the state of the art. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 50, p.161±177, 2000.
- MÜLLER, R. H.; RADTKE, M.; WISSING, S. A. Solid lipid nanoparticles (SLN) and nanostructured lipid carriers (NLC) in cosmetic and dermatological preparations. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 54, n. 1, p. S131–S155, 2002.
- MUÑOZ, A. J. C. et al. Antifúngicos disponibles para el tratamiento de las micosis ungueales. **Revista Iberoamericana Micología**, v. 27, n. 2, p. 49–56, 2010.
- MURALIMOHAN, A. et al. Dissectiong microbiological systems using materials science. **Trends in Microbiology**, v. 17, p. 100-108, 2009.
- MURDAN, S. Drug delivery to the nail following topical application. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 236, p. 1- 26, 2002.
- MURDAN, S. Enhancing the nail permeability of topical applied drugs. **Expert Opinion on Drug Delivery**, v, 5 (11), p. 1267-1282, 2008.
- MURDAN, S. The nail: Anatomy, Physiology, Diseases, and Treatment. In **Topical Nail Products and Ungual Drug Delivery**; Murthy, S. N., Maibach, H. I., Eds.; Taylor & Francis Group, CRC Press, New York, p 1-35, 2013.

MURTHY, S. N.; MAIBACH, H. I. Topical Nail Products and Ungual Drug Delivery. **Taylor & Francis Group**, CRC Press,, New York, US, 2013.

NAKASHIMA, T. et al. Experimental tinea unguium model to assess topical antifungal agents using the infected human nail with dermatophyte *in vitro*. **Journal of Infect Chemotherapy**, v. 8, p. 331-335, 2002.

NASCIMENTO, P. F. C. et al. Atividade antimicrobiana dos óleos essenciais: uma abordagem multifatorial de métodos. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 17, n. 1, p. 108-113, 2007.

NIELSEN, L.S.; SCHUBERT, L.; HANSEN, J. Bioadhesive drug delivery systems. Characterisation of mucoadhesive properties of systems based on glyceryl mono-oleate and glyceryl monolinoleate. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v.6,p.231-239,1998.

NOSKIN, G. A. et al. The burden of *Staphylococcus aureus* infections on hospitals in the United States. **Archives of Internal Medicine**, v. 165, n 15, p.1756-1761, 2005.

NUNLEY, K. S.; CORNELIUS, L. Current Management of Onychomycosis. **Journal of Hand Surgery**, v. 33A, p. 1211-1214, 2008.

NYIRJESY, P. Vulvovaginal candidiasis and bacterial vaginosis. **Infectious Disease Clinics of North America**, v. 22, p. 637–652, 2008.

ODDS, F. C.; WEBSTER, C. E.; ABBOTT, A. B. Antifungal relative inhibition factors: BAY 1–9139, bifonazole, butoconazole, isoconazole, itraconazole (R 51211), oxiconazole, Ro 14–4767/002, sulconazole, terconazole and vibunazole (BAY n-7133) compared *in vitro* with nine established antifungal agents. **Journal Antimicrobial Chemotherapy**, v. 14, p. 105-114, 1984.

OLIVEIRA, C. P. et al. An algorithm to determine the mechanism of drug distribution in lipid-core nanocapsule formulations. **Soft Matter**, v. 9, p. 1141-1150, 2013.

OURIQUE, A. F. et al. Tretinoin-loaded nanocapsules: Preparation, physicochemical characterization, and photostability study. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 352, p. 1-4, 2008.

OURIQUE, A. F. et al. Improved photostability and reduced skin permeation of tretinoin: Development of a semisolid nanomedicine. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 79, p. 95-101, 2011.

PADMAVATHY, N.; VIJAYARAGHAVAN, R. Enhanced bioactivity of ZnO Nanoparticles- an antimicrobial study. **Science and Technology of Advanced Materials**, v. 9, 035004, p. 7, 2008.

PAIVA, L. A. F. et al. Investigation on the wound healing activity of oleo-resin from *Copaifera langsdorffi* in rats. **Phytotherapy Research**, v. 16, p. 737-739, 2002.

PANDEY, R. et al. Poly (DL-lactide-co-glycolide) nanoparticle-based inhalable sustained drug delivery system for experimental tuberculosis. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 52, p. 981-986, 2003.

PANDEY, R. et al. Nano-encapsulation of azole antifungals: Potential applications to improve oral drug delivery. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 301, p. 268-276, 2005.

PANDEY, R.; KHULLER, G. K. Solid lipid particle-based inhalable sustained drug delivery system against experimental tuberculosis. **Tuberculosis** v. 85, p. 227-234, 2005.

PANDEY, R.; SHARMA, S.; KHULLER, G. K. Oral solid lipid nanoparticle-based antitubercular chemotherapy. **Tuberculosis**, v. 85, p. 415-420, 2005.

PARDEIKE, J. et al. Development of an itraconazole-loaded nanostructured lipid carrier (NLC) formulation for pulmonary application. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 419, p. 329-338, 2011.

PARDEIKE, J.; HOMMOSS, A.; MÜLLER, R. H. Lipid nanoparticles (SLN, NLC) in cosmetic and pharmaceutical dermal products. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 366, p. 170-184, 2009.

PENG, H.-S. et al. Voriconazole into PLGA nanoparticles: Improving agglomeration and antifungal efficacy. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 352, p. 29-35, 2008.

PERUGINI, P. et al. Effect of nanoparticle encapsulation on the photostability of the sunscreen agent, 2-ethylhexyl-p-methoxycinnamate. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 246, p. 37-45, 2002.

PIERI, F. A.; MUSSI, M. C.; MOREIRA, M. A. S. Óleo de copaíba (*Copaifera* sp.): histórico, extração, aplicações industriais e propriedades medicinais. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v.11, n. 4, p. 465-472, 2009.

POHLMANN, A. R. et al. Poly( $\epsilon$ -caprolactone) microcapsules and nanocapsules in drug delivery. **Expert Opinion on Drug Delivery**, v. 10, n. 5, p. 623-638, 2013.

POLETTI, F. S. et al. The effect of polymeric wall on the permeability of drug-loaded nanocapsules. **Materials Science and Engineering C**, v. 28, p. 472-478, 2008.

RAMOS-E-SILVA, M.; CASTRO, M. C. R. Fundamentos de Dermatologia - Edição Revista e Atualizada. Rio de Janeiro: **Editora Atheneu**, 2010.

RANJITA, S.; LOAYE, A. S.; KHALIL, M. Present status of nanoparticle research for treatment of tuberculosis. **Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**, v. 14, n. 1, p. 100-116, 2011.

RAWLINGS, A. V. Recent advances in skin 'barrier' research. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 62, p. 671-677, 2010.

REPKA, M., A.; MIDIDODDI, P. K.; STODGHILL, S., P. Influence of human nail etching for the assessment of topical onychomycosis therapies. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 282, p. 95-106, 2004.

RIBEIRO, R. F. et al. Spray-dried powders improve the controlled release of antifungal tioconazole-loaded nanocapsules compared to lyophilized products. **Materials Science and Engineering C**, v. 59, p. 875–884, 2016.

RIGO, L. A. et al. Evaluation of the spreadability of pharmaceutical or cosmetic semisolid formulations using scanned images. **Latin America Journal of Pharmacy**, v. 31, n. 10, p. 1387-1391, 2012.

SABOKTAKIN, M. R. et al. Development and in vitro evaluation of thiolated chitosan-Poly(methacrylic acid) nanoparticles as a local mucoadhesive delivery system. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 48, p. 403-407, 2011.

SANDHIYA, S.; DKHAR, S.A.; SURENDIRAN, A. Emerging trends of nanomedicine- an overview. **Fundamental & Clinical Pharmacology**, v. 23, p. 263-269, 2009.

SANNA, V.; CARIA, G.; MARIANI, A. Effect of lipid nanoparticles containing fatty alcohols having different chain length on the ex vivo skin permeability of Econazole nitrate. **Powder Technology**, v. 201, p. 32–36, 2010.

SANTOS, A. O. et al. Antimicrobial activity of Brazilian copaiba oils obtained from different species of the *Copaifera* genus. **Instituto Oswaldo Cruz**, v 103, n. 3, p. 277-281, 2008.

SANTOS, S. S., et al. Clotrimazole-loaded Eudragit® RS100 nanocapsules: Preparation, characterization and in vitro evaluation of antifungal activity against *Candida* species. **Materials Science and Engineering C**, v. 33, p. 1389–1394, 2013.

SANTOS, S. S., et al. Formulation and in vitro evaluation of coconut oil-core cationic nanocapsules intended for vaginal delivery of clotrimazole. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 116, p. 270–276, 2014.

SAHOO, S. K.; LABHASETWAR, L. Nanotech approaches to drug delivery and imaging. **Drug discovery today**, v. 8, n 24, p. 1112-1120, 2003.

SAHOO, S. K.; PARVEEN, M. S.; PANDA, M.S. The present and future of nanotechnology in human health care. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine**, v. 3, p. 20-31, 2007.

SATTLER, E.; KAESTLE, R.; ROTHMUND, G.; WELZEL, J. Confocal laser scanning microscopy, optical coherence tomography and transonychia water loss for *in vivo* investigation of nails. **British Journal of Dermatology**, v.166 (4), p.740-746, 2012.

SAVIAN, A. L. **Desenvolvimento de nanocápsulas contendo ditranol e sua incorporação em formulação semissólida de base aquosa. 2012.** 114p. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2012.

- SAVIAN, A. L. et al. Dithranol-loaded lipid-core nanocapsules improve the photostability and reduce the in-vitro irritation potential of this drug. **Materials Science and Engineering C**, v. 46, p. 69–76, 2015.
- SHAH, P. P. et al. Skin permeating nanogel for the cutaneous co-delivery of two anti-inflammatory drugs. **Biomaterials**, v. 33, p. 1607-1617, 2012.
- SCHAFFAZICK, S. R.; GUTERRES, S. S.; FREITAS, L. L.; POHLMANN, A. R. Caracterização e estabilidade físico-química de sistemas poliméricos nanoparticulados para administração de fármacos. **Química Nova**, v. 26, p. 726-737, 2003.
- SCHÄFER-KORTING, M.; MEHNERT, W.; KORTING, H-C. Lipid nanoparticles for improved topical application of drugs for skin diseases. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 59, p. 427-443, 2007.
- SCHAR, R. K. Nail disorders – one of dermatology’s last frontiers. **Dermatologic Therapy**, v. 20, p. 1-2, 2007.
- SCHREML, S. et al. The impact of the pH value on skin integrity and cutaneous wound healing. **Journal of the European Academy of Dermatology and Vanereology**, v. 24, p. 373-378, 2010.
- SHIVAKUMAR, H. N. et al. Ungual and transungual drug delivery. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, p. 1–11, 2011.
- SHIVAKUMAR, H. N.; REPKA, M. A.; MURDAN, S.; MURTHY, S. N. Topical Nail Formulations. In **Topical Nail Products and Ungual Drug Delivery**; Murthy, S. N., Maibach, H. I., Eds.; Taylor & Francis Group, CRC Press, New York, p 61-86, 2013
- SIDRIM, J. J. C.; ROCHA, M. F. G. Micologia médica a luz de autores contemporaneos. **Editora Guanabara Koogan S.A.** Copyright. Rio de Janeiro, RJ, 2004.
- SIQUEIRA, N. M. **Desenvolvimento tecnológico e avaliação de penetração cutânea de benzofenona-3 a partir de nanocápsulas revestidas com quitosana.** (Dissertação de Mestrado). Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 106. Porto Alegre, 2008.
- SIQUEIRA, N. M.; CONTRI, R. V.; PAESE, K.; BECK, R. C. R.; POHLMANN, A. R.; GUTERRES, S. S. Innovative Sunscreen Formulation Based on Benzophenone-3-Loaded Chitosan-Coated Polymeric Nanocapsules. **Skin Pharmacology and Physiology**, v. 24, p. 166–174, 2011.
- SONNEX, C. Genital allergy. **Sexually Transmitted Infection**, v. 80, p. 4-7, 2004.
- SOOG, Y-Y.; BARLOW, P. J. Antioxidant activity and phenolic content of selected fruit seeds. **Food Chemistry**, v. 88, p. 411-417, 2004.
- SOBUE, S.; SEKIGUCHI, K. Difference in percutaneous absorption and intracutaneous distribution in guinea pigs among topical antifungal drugs (tioconazole solution, tioconazole cream, miconazole nitrate solution and bifonazole solution). **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, v. 27, n. 9, p. 1428-1432, 2004.

SOUTO, E. B. et al. Development of a controlled release formulation based on SLN and NLC for topical clotrimazole delivery. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 278, p. 71-77, 2004a.

SOUTO, E. B. et al. Evaluation of the physical stability of SLN and NLC before and after incorporation into hydrogel formulations. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 58, p. 83-90, 2004b.

SOUTO, E. B.; MÜLLER, R. H. SLN and NLC for topical delivery of ketoconazole. **Journal of Microencapsulation**, v. 22, n. 5, p. 501-510, 2005.

SOUZA, A. L. R. et al., Nanotechnology-based Drug Delivery Systems for Dermatocycosis Treatment. **Current Nanoscience**, v. 8, p. 512-519, 2012.

SPIELMANN, H. Ocular Irritation. In: In vitro methods in pharmaceutical research. cap. 12, p. 265-287, 1997.

STUBB, S. et al. Contact allergy to tioconazole. **Contact Dermatitis**, v. 26, n. 3, p. 155-158, 1992.

SYED, T. A. et al. Treatment of toenail onychomycosis with 2% butenafine and 5% *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil in cream. **Tropical Medicine and International Health**, v. 4, n. 4, p. 284-287, 1999.

SVETLICHNY, G. et al. Solid lipid nanoparticles containing copaiba oil and allantoin: development and role of nanoencapsulation on the antifungal activity. **Die Pharmazie** (Berlin), v. 70, p. 155-164, 2015.

SWEETMAN, S. C. **Martindale**: Guia Completa de Consulta Fármaco-Terapéutica. 2ª ed. Barcelona: Pharma Editores, S.L. p. 588, 2006.

TAKEUCHI, H.; THONGBORISUTE, J.; MATSUI, Y.; SUGIHARA, H.; YAMAMOTO, H.; KAWASHIMA, Y. Novel mucoadhesion tests for polymers and polymer-coated particles to design optimal mucoadhesive drug delivery systems. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v.57, p.1583-1594, 2005.

TEIXEIRA, Z. et al. Retinyl palmitate flexible polymeric nanocapsules: Characterization and permeation studies. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 81, p. 374-380, 2010.

TUAN-MAHMOOD, T. M. et al. Microneedles for intradermal and transdermal drug delivery. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 50 (5), p. 623-637, 2013.

VAGHASIYA, H.; KUMAR, A.; SAWANT, K. Development of solid lipid nanoparticles based controlled release system for topical delivery of terbinafinehydrochloride. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 49, p. 311-322, 2013.

VAUTHIER, C.; BOUCHEMAL, K. Methods for the preparation and manufacture of polymeric nanoparticles. **Pharmaceutical Research**, v. 26, n. 5, p. 1025-1058, 2009.

- VAVIA, P.; WAVIKAR, P. Nanolipidgel for enhanced skin deposition and improved antifungal activity. **AAPS PharmSciTech**, v. 14, n. 1, p. 222-233, 2013.
- VEIGA JUNIOR, V. F.; PINTO, A. C. O Gênero *Copaifera* L. **Quimica Nova**, v. 25, n. 2, p. 273-286, 2002.
- VEN, V. H. et al. PLGA nanoparticles and nanosuspensions with amphotericin B: Potent in vitro and in vivo alternatives to Fungizone and AmBisome. **Journal of Controlled Release**, v. 161, p. 795-803, 2012.
- VENTURINI, C. G. et al. Formulation of lipid core nanocapsules. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 375, p. 200-208, 2011.
- VENTURINI, C. G. et al. Co-encapsulation of imiquimod and copaiba oil in novel nanostructured systems: promising formulations against skin carcinoma. **Pharmaceutical Sciences**, v. 79, p. 36 –43, 2015.
- VERMOUT, S. et al. Pathogenesis of dermatophytosis. **Mycopathologia** , v. 166, p: 267-275, 2008.
- WALTON, S. F. et al. Acaricidal activity of *Melaleuca alternifolia* (Tea Tree) oil. **Archives of Dermatology**, v. 140, p. 503-506, 2004.
- WANG, Y. et al. Preparation and stability study of norfloxacin-loaded solid lipid nanoparticle Suspensions. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 98, p. 105-111, 2012.
- WEISS-ANGELI, V. et al. Nanocapsules of octyl methoxycinnamate containing quercetin delayed the photodegradation of both components under ultraviolet A radiation. **Journal of Biomedical Nanotechnology**, v. 4, p. 80-89, 2008.
- WELSH, O.; VERA-CABRERA, L.; WELSH, E. Onychomycosis. **Clinics in Dermatology**, v. 28, p. 151-159, 2010.
- XIAO, B.; SI, X.; HAN, M. K.; VIENNOIS, E.; ZHANG, M.; MERLINB, D. Co-delivery of camptothecin and curcumin by cationic polymeric nanoparticles for synergistic colon cancer combination chemotherapy. **Journal of Materials Chemistry B**, v. 3, p. 7724-7733, 2015.
- YADAV, M.; AHUJA, M. Preparation and evaluation of nanoparticles of gum cordia, an anionic polysaccharide for ophthalmic delivery. **Carbohydrate Polymers**, v. 81, p. 871-877, 2010.
- YAMAGUCHI, M. H.; GARCIA, R. F. Óleo de Copaíba e Suas Propriedades Medicinais: Revisão Bibliográfica. **Revista Saúde e Pesquisa**, v. 5, n. 1, p. 137-146, 2012.
- YAZDANPARAST, A. S.; BARTON, R. C. Arthroconidia production in *Tricophyton rubrum* and a new ex vivo model of onychomycosis. **Journal of Medical Microbiology**, v. 55, p. 1577-1581, 2006.

ZANOTTO-FILHO, A. et al. Curcumin-loaded lipid core nanocapsules as a strategy to improve pharmacological efficacy of curcumin in glioma treatment. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 83, p. 156–167, 2013.

ZHANG, L. et al. Development of nanoparticles for antimicrobial drug delivery. **Current Medicinal Chemistry**, v. 17, p. 585-594, 2010.

ZILI, Z.; SFAR, S.; FESSI, H. Preparation and characterization of polycaprolactone nanoparticles containing griseofulvin. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 294, p. 261-267, 2005.