



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO

CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE

DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

JULIANA KISHISHITA

**DESENVOLVIMENTO E AVALIAÇÃO DO DESEMPENHO DE FORMULAÇÕES
UNGUEAIS À BASE DE CICLOPIROX OLAMINA**

RECIFE

2022

JULIANA KISHISHITA

**DESENVOLVIMENTO E AVALIAÇÃO DO DESEMPENHO DE FORMULAÇÕES
UNGUEAIS À BASE DE CICLOPIROX OLAMINA**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas do Departamento de Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial à obtenção do título de Doutora em Ciências Farmacêuticas. Área de Concentração: Fármacos e Medicamentos.

Orientadora: Prof^a. Dra. Leila Bastos Leal

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

RECIFE

2022

Catálogo na Fonte
Bibliotecário: Rodrigo Leopoldino Cavalcanti I, CRB4-1855

K61d Kishishita, Juliana.
Desenvolvimento e avaliação do desempenho de formulações ungueais à base de ciclopírox olamina / Juliana Kishishita. – 2022.
149 f. : il. ; tab. ; 30 cm.

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

Inclui referências, apêndices e anexo.

1. Onicomicose. 2. Ciclopírox. 3. Unhas. 4. Tópico. 5. Técnicas In Vitro. I. Leal, Leila Bastos (Orientadora). II. Charro, Maria Begõna Delgado (Coorientadora). III. Título.

615 CDD (23.ed.) UFPE (CCS2023-036)

JULIANA KISHISHITA

**DESENVOLVIMENTO E AVALIAÇÃO DO DESEMPENHO DE FORMULAÇÕES
UNGUEAIS À BASE DE CICLOPIROX OLAMINA**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em
Ciências Farmacêuticas do Departamento de Ciências
Farmacêuticas da Universidade Federal de
Pernambuco, como requisito parcial à obtenção do
título de Doutora em Ciências Farmacêuticas.
Área de Concentração: Fármacos e Medicamentos.

BANCA EXAMINADORA

Prof^a. Dr^a. Leila Bastos Leal
Universidade Federal de Pernambuco
Orientadora – Presidente

Prof. Dr. Davi Pereira de Santana
Universidade Federal de Pernambuco
Examinador Interno

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

Profa. Dra. Giovana Damasceno Sousa
Universidade Federal do Oeste da Bahia
Examinadora Externa

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

Aprovada em: 06/05/2022

**Aos meus pais Julieta e Mutsujiro (*in memoriam*),
por toda dedicação e amor
incondicional.**

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar, agradeço à Deus, por permitir que eu tenha chegado até aqui, agradeço também pelos momentos de dificuldade que me fizeram mais forte.

Agradeço e dedico esse trabalho à minha família que sempre acredita que sou capaz. Em especial ao meu pai Mutsujiro (*in memoriam*), minha eterna saudade, você sempre foi e será meu exemplo de caráter, dedicação e compromisso. E à minha mãe Julieta, estrela da minha vida, que me ilumina, guia e cuida de mim, te agradeço por me incentivar em tudo, me amar e por estar sempre ao meu lado.

A todos os meus amigos que tenho o prazer de dividir minha vida, minhas alegrias e meus perrengues, saibam que vocês são essenciais para mim. Agradeço também a todos os amigos de laboratório que durante tantos anos compartilham muito mais que uma rotina, obrigada por todo aprendizado. Ter vocês ao meu lado, é um presente. Em especial, agradeço a Camila, por toda parceria nesse e em outros trabalhos.

À minha orientadora, Profa. Leila, minha eterna gratidão por toda confiança, parceria e incentivo, além do carinho e amizade. Deixo registrado minha admiração e respeito.

Ao Prof. Davi Santana, agradeço a confiança, os ensinamentos e experiências compartilhadas ao longo da minha trajetória no laboratório. Saiba que sou grata por todo suporte e pelas oportunidades que me foram dadas.

Ao Prof. Danilo, agradeço a parceira neste e em todos os outros projetos desenvolvidos. Além da confiança no meu trabalho, agradeço a amizade durante todo esse tempo de convívio.

À Profa. Danielle Macêdo, pela colaboração com todas as etapas do estudo microbiológico, obrigada pela disponibilidade em nos ajudar.

À Profa. Begoña Charro, que conheci há cinco anos, em visita aqui no NUDFAC, agradeço a colaboração durante a realização deste trabalho, principalmente no que trata das discussões dos resultados obtidos.

A todos os voluntários que doaram suas unhas, sem vocês, este trabalho não teria sido possível.

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

E por fim, meus agradecimentos a todos que contribuíram com o meu crescimento pessoal e profissional para que eu chegasse até aqui e pudesse concretizar mais este ciclo.

RESUMO

A Onicomicose (ONC) é uma infecção fúngica crônica da unha, com prevalência global estimada em 5,5% no ano de 2017. Os efeitos desta infecção, quando não tratada, podem incluir dor, infecções bacterianas secundárias, incapacidade de usar sapatos, baixa autoestima e constrangimento emocional devido à desfiguração das unhas afetadas. A unha é a barreira mais resistente da estrutura ungueal para a penetração de fármacos, devido a sua composição e a presença de muitas pontes dissulfeto que interligam as fibras de queratina. Isto está, portanto, diretamente relacionado a baixa eficácia do tratamento com antifúngicos (AFs) tópicos. Diante disto, os AFs orais são ainda, amplamente utilizados. Estes, por sua vez, causam diversos efeitos colaterais, e riscos significativos quanto às interações medicamentosas. O Ciclopirox (CPO), primeiro fármaco disponível no mercado internacional e brasileiro, para tratamento tópico da ONC na forma de esmalte 8%, apresenta amplo espectro de ação, sendo um agente fungicida e fungistático. Porém, estes esmaltes apresentam grandes limitações e, apesar de facilmente aplicados, como são baseados no uso de solventes orgânicos que evaporam, deixam na placa ungueal o fármaco cristalizado que é incapaz de particionar ou difundir para o leito ungueal, diminuindo assim a sua eficácia. Diante disto, o objetivo do trabalho foi desenvolver e avaliar o desempenho de formulações ungueais de base aquosa, simples, de baixo custo e mais eficazes que aquelas disponíveis comercialmente. A relevância da microporação ungueal como auxiliar na permeação e a eficácia microbiológica *in vitro* também foram investigadas. Para tanto, a solubilidade do CPO foi avaliada em diferentes solventes e formulações gelificadas contendo 8 e 16% de ativo foram desenvolvidas. Foram realizadas avaliações de liberação (IVRT) em 3 diferentes tipos de membranas artificiais e permeação ungueal (IVPT) mediante recortes de unhas humanas, obtidas de voluntários saudáveis, após consentimento livre informado. Células verticais de difusão de Franz com e sem adaptadores de unha foram empregados nesses ensaios. No IVPT foram realizados dois arranjos de testes, no primeiro foi aplicada uma dose múltipla em unhas não poradas (MD-NP) e no segundo, foi aplicada uma dose única em unhas microporadas (SD-MP) com o dispositivo Hydra.needle™. Ambos os estudos tiveram duração de 14 dias, seguido da quantificação do fármaco no líquido receptor e recuperação do fármaco na unha. Como resultados, o CPO apresentou alta solubilidade nas misturas de solventes quando comparados a estes isoladamente; a quantidade cumulativa liberada de CPO através das membranas hidrofílica e de silicone foi significativamente diferente entre as formulações geleificadas e o produto referência (Micolamina®). Após os experimentos iniciais de IVPT utilizando duas formulações e testando os dois arranjos de testes (MD-NP e SD-MP), os

resultados sugeriram que a combinação da microporação ungueal com dose única do produto favoreceria a permeação do fármaco e, portanto, as demais formulações foram testadas com o arranjo SD-MP. Todas as formulações, exceto GH1, apresentaram retenção de CPO significativamente maior que a Micolamina®. Nos experimentos SD-MP, a passagem do fármaco através da unha, deixou clara a importância da microporação enquanto um promotor físico de permeação, simples, seguro e passível de padronização. Em consistência com os resultados de IVPT, a porcentagem de inibição da atividade de *T. rubrum* observada com unhas microporadas para formulações de gel foi maior do que o determinado para unhas não poradas. No entanto, a microporação não modificou o efeito inibitório causado pela Micolamina®. Os resultados mostraram que as novas formulações aqui propostas disponibilizaram o fármaco de forma mais eficiente quando comparados ao esmalte comercial e sugerem que mais estudos devem ser realizados com as melhores formulações desenvolvidas e que um dispositivo específico de microporação da unha deve ser projetado.

Palavras-chave - onicomicose; ciclopirox olamina; unhas; tópico; método *in vitro*.

ABSTRACT

Onychomycosis is a chronic fungal nail infection, with an estimated global prevalence of 5.5% in the year 2017. The effects of this infection, when untreated, can include pain, secondary bacterial infections, inability to wear shoes, low self-esteem and emotional embarrassment due to disfigurement of the affected nails. The nail is the most resistant barrier of the nail structure for the penetration of drugs, due to its composition and the presence of many disulfide bridges that connect the keratin fiber. Therefore, this is directly related to the low effectiveness of the treatment after the use of topical antifungals (AFs). Given this, oral AFs are still widely used. These, however, cause several side effects, and significant risks regarding drug interactions. Ciclopirox (CPO), the first drug available on the international and Brazilian market, for topical treatment of ONC in the form of 8% nail lacquer, has a broad spectrum of action, being a fungicidal and fungistatic agent. These nail lacquers have great limitations and, although they are easily applied, as they are based on the use of organic solvents that evaporate, they leave the crystallized drug on the nail plate that is unable to partition or diffuse into the nail bed, thus decreasing the effectiveness of the product. Given this, the objective of the work was to develop and evaluate the performance of simple nail formulations, of low cost and more effective than those commercially available containing cyclopirox olamine for the treatment of onychomycosis. For this purpose, the solubility of the CPO was investigated in different solvents and 11 gelled formulations containing 8 and 16% active were developed. Release assessments (IVRT) were performed on 3 different types of artificial membranes and nail permeation (IVPT) using human nail clippings, obtained from healthy volunteers, after informed consent. In order to do so, vertical Franz diffusion cells were used with and without PermeGear nail adapters. In the IVPT, two sets of tests were performed. In the first one, the nail file was sanded on the dorsal side as a pretreatment and 10 μ L of formulation was applied to the nails every day after the cleaning procedure. In the second set of tests, sanding was associated with microporation using Hydra.needle™ and application of 50 μ L only once, on the first day of the test. Both studies lasted 14 days, followed by the quantification of the drug in the recipient fluid and recovery of the active ingredient in the nail. The CPO showed high solubility in the mixtures of solvents when compared to these alone; the cumulative amount of CPO released through the hydrophilic and silicone membranes was significantly different between Micolamine® and both gel formulations. After the initial IVPT experiments using two formulations and testing the two test arrangements (MD-NP and SD-MP), the results suggested that the combination of nail microporation with a single dose of the product would favor drug

permeation and therefore, the other formulations were tested with the SD-MP arrangement. All formulations, except GH1, showed significantly higher CPO retention than Mycolamine®. In the SD-MP experiments, the passage of the drug through the nail made clear the importance of microporation as a physical permeation promoter, simple, safe and subject to standardization. Consistent with the IVPT results, the percentage of inhibition of *T. rubrum* activity observed with microporated nails for gel formulations was greater than that determined for non-porous nails. However, microporation did not modify the inhibitory effect caused by Micolamina®. The results showed that the new formulations proposed in this work made the drug available more efficiently when compared to commercial lacquer and suggest that more studies should be carried out with the best formulations developed, and that a specific nail microporation device should be designed.

Keywords - onychomycosis; ciclopirox; nails; *in vitro* Technique.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Estruturas da unidade ungueal.....	26
Figura 2 -	Onicomicose subungueal distal e lateral.....	34
Figura 3 -	Onicomicose superficial branca.....	35
Figura 4 -	Onicomicose subungueal proximal.....	36
Figura 5 -	Onicomicose endoníaca.....	36
Figura 6 -	Onicomicose distrófica total.....	37
Figura 7 -	Tira de teste imunocromatográfico de dermatófito FungiCheck, HFL Laboratories, Holanda.....	39
Figura 8 -	Diferentes esmaltes de fabricação própria encontrados em farmácias de manipulação.....	47
Figura 9 -	Estrutura química do Ciclopirox olamina.....	50
Figura 10 -	Célula de difusão vertical de Franz com adaptador de unha.....	54
Figura 11 -	PathFormer®.....	58
Figura 12 -	Clearanail®.....	58
Figura 13 -	Unha micótica antes e depois da perfuração.....	59
Figura 14 -	Derma roller (<i>In finite Beauty, Birmingham, UK</i>).....	59
Figura 15 -	Imagem de microscopia de campo amplo de tecido ungueal saudável criossecionado, exibindo a morfologia da placa ungueal e as medições da morfologia dos microporos (vermelho).....	60
Figura 16 -	Ilustração da célula de difusão estática modificada (TurChub®).....	62
Figura 17 -	Células TurChub® em estudo com diferentes fármacos, utilizando lâmina ungueal humana.....	62
Figura 18 -	Ensaio <i>in vitro</i> de desempenho microbiológico.....	63
Figura 19 -	Ilustração do modelo <i>in vitro</i> em ADS.....	64
Figura 20 -	Célula vertical de difusão de Franz.....	71
Figura 21 -	Procedimentos de lixamento (A e B) e microporação da unha no lado dorsal com agulhas de titânio (Hydra.needle™) (C).....	73
Figura 22 -	Processo de emblocamento da unha para corte em criostato. Aplicação do gel para emblocamento (A) e unha emblocada em gel (após congelamento) (B).....	73

Figura 23 -	Adaptador ungueal PermeGear para as células de Franz (a) e montagem da unha no adaptado (b).....	75
Figura 24 -	Unha após estudo de permeação.....	76
Figura 25 -	Configuração do ensaio microbiológico <i>in vitro</i> usado neste trabalho conforme adaptado de Sleven <i>et al.</i> (2015). (A): conjunto unha-frasco antes do fechamento, (B): conjunto frasco-unha colocado em meio de ágar durante a etapa de pré-carga, (C): conjunto frasco-unha colocado em meio contaminado e (D): imagem representativa do halo de inibição formado.....	78
Figura 26 -	Esquema da seleção de artigos.....	79
Figura 27 -	Diagrama com informações sobre os artigos de desenvolvimento de formulação.....	81
Figura 28 -	Diagrama com informações sobre os artigos de desenvolvimento de formulação comparadas a formulações comercializadas.....	82
Figura 29 -	Diagrama com informações sobre os artigos de avaliação de formulação do mercado, utilizando novas técnicas.....	83
Figura 30 -	Amplitude de publicações por países.....	85
Figura 31 -	Cromatograma referente ao ponto 100 µg/mL.....	92
Figura 32 -	Representação gráfica das respostas em função da concentração do analito.....	93
Figura 33 -	Quantidade cumulativa (%) de CPO (média ± DP, n=6) liberada <i>in vitro</i> de GH1, GP1 e esmalte Micolamina® (média ± DP, n = 6) através de membrana hidrofílica (celulose) e membranas hidrofóbicas (PTFE e silicone). Efeito significativo (p<0,05) para a quantidade total liberada entre diferentes membranas (*) (ANOVA one-way, post-hoc Bonferroni).....	100
Figura 34-	Resultados (média ± DP, n=6) de IVRTs realizados com formulações de gel de HPMC GH1, GH2, GH3, GH4, GH5, GH6 e Micolamina®. Gráficos superiores: quantidade cumulativa liberada através das membranas hidrofóbicas de PTFE (coluna esquerda) e silicone (coluna direita). Gráficos inferiores: porcentagem de CPO liberada em relação à dose aplicada. Os géis GH1, GH5 e Micolamina® continham 8% de CPO enquanto os géis GH2, GH3, GH4 e GH6	

	continham 16% de CPO. Efeito significativo ($p < 0,05$) para a quantidade total liberada entre diferentes membranas (*) (ANOVA one-way, post-hoc Bonferroni).....	104
Figura 35 -	Quantidade cumulativa de CPO (média $\pm$ DP, $n=6$) liberada <i>in vitro</i> dos géis GH6, GH6-GK, GH6-GL, GH6-GP, GH6-E e GH6-G através das membranas de PTFE. Efeito significativo ($p < 0,05$) para a quantidade total liberada entre diferentes membranas (*) (ANOVA one-way, post-hoc Bonferroni).....	105
Figura 36 -	Média ($\pm$ DP, $n=6$) da liberação percentual cumulativa de CPO durante testes de IVRT realizados com formulações de termogéis GP1-GP5 e Micolamina®. Os termogéis GP2-GP5 foram carregados com 16% da droga, enquanto Micolamina® e GP1 continham 8% de CPO. Efeito significativo ($p < 0,05$) para a quantidade total liberada entre diferentes membranas (*) (ANOVA one-way, post-hoc Bonferroni). Painel direito: Os dados correspondentes a GP1 e GP2 foram deslocados 0,1h para a direita para melhorar a visibilidade. Painel esquerdo: os dados correspondentes ao GP2 foram ajustados em 0,1h e GP4 foi ajustado em 0,2h para melhorar a visibilidade.....	106
Figura 37 -	Quantidade de CPO (média $\pm$ DP, $n=4$) recuperada da unha (CPO-unha) após experimentos MD-NP e SD-MP conduzidos com formulações de gel (GH1 8%), termogel (GP1 8%) e Micolamina® esmalte. Efeito significativo ($p < 0,0001$) da poração (*); significativamente (0,0001) diferente de todas as outras formulações nas condições SD-MP (a) e MD-NP (b).....	110
Figura 38 -	Quantidade de CPO (média $\pm$ DP, $n=4$) recuperada da unha (CPO-unha), após experimentos SD-MP de 14 dias de duração conduzidos com formulações de gel de HPMC. Retenção significativa ($p < 0,05$) em comparação com Micolamina® (*). A mesma letra indica grupos homogêneos (ANOVA one-way, post-hoc de Bonferroni, $\alpha < 0,05$)....	111
Figura 39 -	Quantidade de CPO (média $\pm$ DP, $n=4$) recuperada da unha (CPO-unha) após a série SD-MP realizados com formulações de termogel e Micolamina®. Os termogéis GP2-GP5 foram carregados com 16% da droga, enquanto Micolamina® e GP1 continham 8% de CPO.	

	Retenção significativa ($p < 0,05$) em comparação com Micolamina® (*). A mesma letra indica grupos homogêneos (ANOVA one-way, post-hoc de Bonferroni, $\alpha < 0,05$).....	113
Figura 40 -	CPO recuperado da unha (CPO-unha) e permeado para o líquido receptor (CPO-LR) após 14 dias do experimento SD-MP realizados com GH6, GH6-GK e esmalte Micolamina® (média $\pm$ DP, $n = 4$). As formulações de gel GH6 e GH6-GK continham 16% de CPO, Micolamina® continha 8% de CPO. Retenção significativa ($p < 0,05$) em comparação com Micolamina® (*). A mesma letra indica grupos homogêneos (ANOVA two-way, post-hoc de Bonferroni, $\alpha < 0,05$)....	114
Figura 41 -	Avaliação microscópica da unha não porada (NP) (a) e da unha microporada (MP) (b).....	115
Figura 42 -	Média ($\pm$ DP, $n = 4$) do percentual de inibição da atividade de <i>T. rubrum</i> após IVPTs com géis (GH6 e GH6 GK 16%) e formulações de Micolamina® de unhas com e sem poros. Efeito significativo ($p < 0,05$) da poração (*). A mesma letra indica grupos homogêneos.....	116

LISTA DE TABELAS E GRÁFICOS

Tabela 1 -	Resumo dos métodos usados para diagnóstico de onicomicose.....	40
Tabela 2 -	Dose e duração dos tratamentos sistêmicos.....	42
Tabela 3 -	Medicamentos tópicos comercializados no Brasil para tratamento de ONC.....	48
Tabela 4 -	Composição das misturas de solventes (em percentual).....	67
Gráfico 1 -	Distribuição dos tipos de unha e de células utilizadas nos trabalhos.....	84
Tabela 5 -	Solubilidade de CPO em diferentes meios. O asterisco (*) indica os veículos selecionados para o desenvolvimento das formulações de gel e termogel.....	86
Tabela 6 -	Composição centesimal dos géis desenvolvidos.....	88
Tabela 7 -	Composição centesimal das formulações GH6 e suas modificações.....	88
Tabela 8 -	Características organolépticas, pH e teor de CPO (média $\pm$ DP) das formulações.....	89
Tabela 9 -	Resultados das avaliações estatísticas realizadas.....	93
Tabela 10 -	Resultados da Repetibilidade.....	94
Tabela 11 -	Dados experimentais da precisão intermediária (analista 1 e analista 2).....	95
Tabela 12 -	ANOVA da precisão intermediária do LIQ.....	95
Tabela 13 -	ANOVA da precisão intermediária do CQB.....	96
Tabela 14 -	ANOVA da precisão intermediária do CQM.....	96
Tabela 15 -	ANOVA da precisão intermediária do CQA.....	96
Tabela 16 -	ANOVA da precisão intermediária do CQD.....	96
Tabela 17 -	Dados experimentais da exatidão.....	97
Tabela 18 -	Dados estatísticos da exatidão.....	97
Tabela 19 -	Média percentual e DP (n = 6) da liberação cumulativa de CPO de formulações através de membranas hidrofílicas (celulose).....	99
Tabela 20 -	Média percentual e DP (n = 6) da liberação cumulativa de CPO de formulações em membranas de silicone.....	99

Tabela 21 -	Média percentual $\pm$ DP (n = 6) da liberação cumulativa de CPO de formulações através de membranas hidrofóbicas (PTFE).....	100
Tabela 22 -	Média percentual $\pm$ DP (n = 6) da liberação cumulativa de CPO de formulações em membranas de silicone.....	102
Tabela 23 -	Média percentual $\pm$ DP (n = 6) da liberação cumulativa de CPO de formulações através de membranas hidrofóbicas (PTFE).	103
Tabela 24 -	Liberação cumulativa de CPO (média $\pm$ DP; n = 6) através de membranas de PTFE expressa como porcentagem da dose aplicada a partir de géis GH6, GH6-GK, GH6-GL e GH6-GP, todos contendo 16% de CPO.....	105
Tabela 25 -	Liberação cumulativa de CPO (média $\pm$ DP; n = 6) através de membranas de silicone expressas como porcentagem da dose aplicada de termogéis de 8% (GP1) e 18% (GP2-GP5) e Micolamina®.....	107
Tabela 26 -	Liberação cumulativa de CPO (média $\pm$ DP; n = 6) através de membranas de PTFE expressa como porcentagem da dose aplicada de termogéis de 8% (GP1) e 18% (GP2-GP5) e Micolamina®.....	107
Tabela 27 -	Quantidade (média $\pm$ DP, n=4) de CPO analisada no líquido receptor (CPO-LR) e extraída da unha (CPO-unha) após a série MD-NP (aplicação diária de 10 μ L) e SD-MP (aplicação única 50 μ L). Todas as formulações continham 8% de CPO.....	109
Tabela 28 -	CPO extraído da unha (CPO-unha) seguindo experimentos SD-MP. Dados individuais de cada experimento são mostrados. Dados expressos em massa de fármaco/massa de unha.....	111
Tabela 29 -	CPO extraído da unha (CPO-unha) seguindo experimentos SD-MP realizados com formulações de termogel (GP) e Micolamina®. Dados individuais de cada experimento são mostrados. Dados expressos em massa de fármaco/massa de unha.....	113
Tabela 30 -	CPO-unha e CPO-LR obtidos após experimentos SD-MP com GH6, GH6-GK e Micolamina® (média $\pm$ DP, n= 4).....	114
Tabela 31 -	Porcentagem de inibição da atividade de <i>T. rubrum</i> observada com formulações de gel e com Micolamina® usando unhas não porodas e microporadas.....	117

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ADS	Ágar Dextrose Sabouraud.
AFs	Antifúngicos.
ANOVA	Análise de Variância.
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária.
BD	Biodisponibilidade.
CAAE	Certificado de Apresentação de Apreciação Ética.
CEP/UFPE	Comitê de Ética em Pesquisa/Universidade Federal de Pernambuco.
CIM	Concentração inibitória mínima.
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência.
CLSI	<i>Clinical and Laboratory Standards Institute.</i>
CPO	Ciclopirox Olamina.
CQA	Controle de qualidade alto.
CQB	Controle de qualidade baixo.
CQD	Controle de qualidade de diluição.
CQM	Controle de qualidade médio.
D.P.	Desvio Padrão.
DAD	Arranjo de Diodos.
DEGEE	Dietilenoglicol monoetil éter.
DPR	Desvio padrão relativo.
EDTA	<i>Ethylenediamine tetraacetic acid.</i>
EUA	Estados Unidos da América.
FDA	<i>Food and Drug Administration.</i>
FFND	Fungos filamentosos não dermatófitos.
FLZ	Fluconazol.
G.L.	Graus de liberdade.
GRV	Griseofulvina.
HIV	Vírus da imunodeficiência humana.
HPLC	<i>High Performance Liquid Chromatography.</i>
HPMC	Hidroxipropilmetilcelulose.
IP	Isopropanol.
ITZ	Itraconazol.

IVPT	<i>in vitro permeation test.</i>
IVRT	<i>in vitro release test.</i>
LD	Limite de detecção.
LIQ	Limite de quantificação.
LogP	Coeficiente de Partição.
LQ	Limite de quantificação.
LR	Líquido receptor.
ME	Microemulsão.
MeSH	<i>Medical Subject Headings.</i>
NA	Não avaliado.
ODT	Onicomicose distrófica total.
OE	Onicomicose endoníaca.
OECD	Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Econômico.
ONC	Onicomicose.
OS	Onicomicose superficial.
OSDL	Onicomicose subungueal distal e lateral.
OSP	Onicomicose subungueal proximal.
PBS	<i>Phosphate-buffered saline.</i>
PD	Uso para pesquisa e desenvolvimento.
PET	Polietileno tereftalato.
pH	Potencial Hidrogeniônico.
pI	Ponto isoelétrico.
PP	Uso no sistema particular privado.
PTFE	Politetrafluoretileno.
PUP	Prega ungueal proximal.
RDC	Resolução de diretoria colegiada.
RL	Uso em laboratório de rotina.
RT-PCR	Reação em cadeia da polimerase em tempo real.
SBD	Sociedade Brasileira de Dermatologia.
TBF	Terbinafina.
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.
UK	United Kingdom.
UV	Ultravioleta.

LISTA DE SÍMBOLOS

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

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	22
2	OBJETIVOS	25
2.1	OBJETIVO GERAL	25
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	25
3	REVISÃO DE LITERATURA	26
3.1	ESTRUTURA DA UNIDADE UNGUEAL	26
3.2	INFECÇÕES FÚNGICAS	29
3.3	ONICOMICOSE	31
3.3.1	Fatores de Risco e prevalência	32
3.3.2	Tipos de Onicomicose	33
3.3.2.1	Onicomicose subungueal distal e lateral (OSDL)	34
3.3.2.2	Onicomicose superficial (OS)	35
3.3.2.3	Onicomicose subungueal proximal (OSP)	35
3.3.2.4	Onicomicose endoníaca (OE)	36
3.3.2.5	Onicomicose distrófica total (ODT)	37
3.3.3	Diagnóstico laboratorial das onicomicoses	38
3.3.4	Tratamento da onicomicose	41
3.3.4.1	Tratamento oral	41
3.3.4.2	Tratamento tópico	44
3.3.4.2.1	<i>Ciclopirox Olamina</i>	49
3.4	LIBERAÇÃO E PERMEÇÃO TRANSUNGUEAL	52
3.4.1	Promotores de permeação	55
3.5	AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIFÚNGICA DE FORMULAÇÕES TÓPICAS	61
4	MATERIAIS E MÉTODOS	65
4.1	MATERIAIS	65
4.2	EQUIPAMENTOS	65
4.3	REVISÃO SISTEMÁTICA	65
4.4	ESTUDO DE SOLUBILIDADE DO CICLOPIROX OLAMINA	67
4.5	DESENVOLVIMENTO DAS FORMULAÇÕES UNGUEAIS DE CICLOPIROX OLAMINA	67

4.6	CARACTERIZAÇÃO DAS FORMULAÇÕES	68
4.6.1	Determinação do pH	68
4.6.2	Doseamento de CPO nas formulações desenvolvidas e na formulação comercial Micolamina® esmalte	69
4.7	VALIDAÇÃO DO MÉTODO ANALÍTICO POR CROMATOGRAFIA LIQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA COM DETECÇÃO DE ARRANJO DE DIODOS (CLAE-DAD).....	69
4.8	ESTUDOS DE CINÉTICA DE LIBERAÇÃO <i>IN VITRO</i> , PERMEAÇÃO <i>EX VIVO</i> E RETENÇÃO UNGUEAL DO CICLOPIROX OLAMINA.....	71
4.8.1	Obtenção, preparo e avaliação microscópica das amostras de unha humana	72
4.8.2	Montagem do sistema manual de células verticais de difusão de Franz para os estudos de liberação e permeação	74
4.8.3	Avaliação de retenção ungueal	76
4.9	AVALIAÇÃO ANTIFÚNGICA <i>IN VITRO</i> DAS FORMULAÇÕES.....	77
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	79
5.1	REVISÃO SISTEMÁTICA	79
5.2	ESTUDO DE SOLUBILIDADE DO CICLOPIROX OLAMINA	86
5.3	DESENVOLVIMENTO DAS FORMULAÇÕES UNGUEAIS DE CICLOPIROX OLAMINA	87
5.4	CARACTERIZAÇÃO DAS FORMULAÇÕES	89
5.5	VALIDAÇÃO DO MÉTODO ANALÍTICO POR CROMATOGRAFIA LIQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA COM DETECÇÃO DE ARRANJO DE DIODOS (CLAE-DAD).....	91
5.5.1	Seletividade	92
5.5.2	Linearidade	93
5.5.3	Precisão e exatidão	94
5.6	ESTUDOS DE CINÉTICA DE LIBERAÇÃO <i>IN VITRO</i> (IVRT).....	98
5.6.1	Análise dos perfis de liberação	98
5.7	AVALIAÇÃO DA PERMEAÇÃO <i>EX VIVO</i> E RETENÇÃO UNGUEAL DO CICLOPIROX OLAMINA	108
5.7.1	Avaliação microscópica das amostras de unha humana	115
5.8	AVALIAÇÃO ANTIFÚNGICA <i>IN VITRO</i> DAS FORMULAÇÕES.....	115

6	CONCLUSÃO.....	118
	REFERÊNCIAS.....	119
	APÊNDICE A – TABELA COM MICs DE ANTIFÚNGICOS USADOS NO	
	TRATAMENTO DE ONICOMICOSE.....	143
	APÊNDICE B – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E	
	ESCLARECIDO.....	147
	ANEXO A – PARACER CONSUBSTANCIADO DO CEP (CAAE).....	149

1 INTRODUÇÃO

A Onicomicose (ONC) é uma infecção fúngica da unha que pode atingir tanto unhas das mãos como dos pés. De acordo com a literatura, esta infecção é responsável por 15 a 50% das doenças ungueais, onde 30% de todos os casos são dermatofitoses. Pode afetar um ou mais componentes do aparelho ungueal, incluindo a lâmina ungueal, a matriz e o leito ungueal (CHOUHAN; SAINI, 2012; FAERGEMANN; BARAN, 2003; MURTHY; MAIBACH, 2012; ZAIAS, 1985).

Segundo Gupta; Versteeg; Shear (2017a), e com base em estudos epidemiológicos publicados na época, a prevalência global foi estimada em 5,5%. De forma mais detalhada, a ONC afeta 3-8% da população do Reino Unido (AMEEN *et al.*, 2014; SHAHZAD *et al.*, 2014), cerca de 2-5 milhões de pessoas, e sua incidência em outros locais é alta, 13,4% na América do Norte, 23% na Europa e 20% no Leste da Ásia (GHANNOUM, MAHMOUD; ISHAM, 2014; GUPTA, ADITYA K.; VERSTEEG, 2016; THOMAS, J. *et al.*, 2010).

No Brasil, poucos estudos foram realizados visando investigar a prevalência de onicomicose. No entanto, de acordo com uma pesquisa realizada em 2010 com 7852 pacientes de diferentes regiões do Brasil, 28,3% apresentaram diagnóstico de onicomicose (CHIAICCHIO *et al.*, 2013). Outros dados mais antigos, mostram prevalências locais em alguns estados e cidades brasileiras, como 68,4% na cidade de João Pessoa (DA SILVA PONTES *et al.*, 2002); 52% no estado do Ceará (BRILHANTE *et al.*, 2005) e 56,4% na cidade de Goiânia (SOUZA *et al.*, 2010).

A incidência da ONC está aumentando devido ao envelhecimento da população (CHADEGANIPOUR; MOHAMMADI; SHADZI, 2016; THOMAS, J. *et al.*, 2010) e a um número crescente de pacientes diabéticos, que são 2,5 vezes mais propensas a desenvolver ONC (GUPTA, ADITYA K.; VERSTEEG, 2016; ROSEN *et al.*, 2015).

As infecções fúngicas cutâneas, um terço das quais são ONC, estavam entre as 5 principais doenças de pele por custo médico direto em 2004 (BICKERS *et al.*, 2006). A alta prevalência em idosos, diabéticos e pacientes imunocomprometidos é particularmente preocupante. A ONC não tratada traz complicações médicas e redução da qualidade de vida, fornece uma fonte para infecções secundárias nos pés, aumentando o risco de ulcerações que podem levar a amputações (ELEWSKI; TOSTI, 2014; GUPTA, ADITYA K.; VERSTEEG, 2016; THOMAS, J. *et al.*, 2010). Além da prevalência crescente, as falhas no tratamento são frequentes; a recorrência pode chegar a 50% devido à falta de cura e reinfecções micológicas. A intervenção precoce é, portanto, crucial, preferencialmente usando uma terapia administrada

pelo paciente, evitando assim complicações e possível hospitalização (ELEWSKI; TOSTI, 2014; THOMAS, J. *et al.*, 2010).

A terapia tópica, isto é, uso de medicamento aplicado diretamente na unha, visando um efeito local, é recomendada apenas para ONC superficial e menos grave. Apesar de seu alto custo, sua eficácia é baixa (CRAWFORD; HOLLIS, 2007; THOMAS, J. *et al.*, 2010), como pode ser verificado, por exemplo, em tratamentos de 18 meses com amorolfina ou ciclopírox que apresentaram menos de 10% de cura completa (AUVINEN *et al.*, 2015).

A lâmina ungueal é a barreira mais resistente da estrutura ungueal para a penetração de fármacos e, portanto, é muito difícil o fármaco atravessá-la (ELSAYED, 2015). Isso acontece, em partes, devido a sua composição de aproximadamente 80% de queratina, 10-30% de água e 0,1-1% de lipídios. A presença de muitas pontes dissulfeto e de hidrogênio que interligam as fibras de queratina, torna a lâmina ungueal uma estrutura extremamente impermeável (ACHTEN; ANDRE; LAPORTE, 1991; CHOUHAN; SAINI, 2012; DE BERKER, 2013; MURDAN, 2002).

A baixa eficácia do tratamento tópico ocorre, principalmente, em virtude da pequena quantidade de antifúngicos (AFs) que consegue atravessar a placa ungueal e chegar até o local da infecção. Assim, os AFs orais são amplamente utilizados, pois são mais eficazes que os produtos de ação tópica. No entanto, mesmo assim, as taxas de cura após vários meses costumam ser inferiores a 50% (ELEWSKI; TOSTI, 2014; GUPTA, ADITYA K.; VERSTEEG, 2016) e por isso, a adesão do paciente pode ser menor que 45% (THOMAS *et al.*, 2010). Além disso, o tratamento oral causa efeitos colaterais, entre eles a hepatotoxicidade com uso da terbinafina (incidência de 3%), necessitando de monitoramento hepático (ELEWSKI; TOSTI, 2014). Para idosos, diabéticos e pacientes imunocomprometidos em uso de múltiplas medicações por longos períodos, as interações medicamentosas com AFs da classe dos azóis apresentam riscos significativos (THOMAS *et al.*, 2010; GHANNOUM; ISHAM, 2014).

Diante disto, o uso unicamente de uma terapia tópica, desde que eficaz, poderia ser mais segura para os pacientes, minimizando a exposição sistêmica.

Novos medicamentos tópicos para esta finalidade disponibilizados recentemente no mercado internacional ainda têm baixa eficácia (taxas de cura completa <10% após 48 semanas de tratamento com tavaborol (ELEWSKI; TOSTI, 2014; GUPTA, ADITYA K.; VERSTEEG, 2016) e <18% após 52 semanas de tratamento com efinaconazol) e são caros (um ciclo completo com efinaconazol custa aproximadamente R\$ 9.550,00 por unha) (MIKAILOV *et al.*, 2016). A baixa eficácia ocorre, mais uma vez, devido à baixa biodisponibilidade local do fármaco, pois

a substância ativa chega em quantidade insuficiente nas camadas mais profundas da unha onde a infecção reside.

Uma estratégia seria aumentar a biodisponibilidade (BD) no leito e na placa ungueal a fim de melhorar a eficácia de ativos não patenteados como ciclopirox olamina e amorolfina e, assim, fornecer uma abordagem mais econômica que reduziria os custos das ONC.

Os esmaltes medicinais atuais procuram sustentar a liberação do fármaco e aumentar a BD mantendo AFs na unha por longos períodos. Uma grande limitação dessa abordagem vem da formulação, tipicamente baseada no uso de solventes orgânicos que evaporam, deixando na placa ungueal o fármaco cristalizado que é incapaz de particionar ou difundir para o leito ungueal. Algumas estratégias são utilizadas, entre elas o uso de promotores de permeação química, como tióis, amolecedores de unhas ou enzimas queratolíticas. Mesmo assim, as taxas de permeação permanecem baixas (ELKEEB *et al.*, 2010; MURDAN, 2008; SHIVAKUMAR *et al.*, 2012). Promotores físicos como abrasão da superfície da placa ungueal; lasers pulsados; microporação; ultrassom de baixa frequência e iontoforese foram testados, mas nenhum foi suficientemente eficaz e econômico para adoção ampla (DELGADO-CHARRO, 2012; ELKEEB *et al.*, 2010; MURDAN, 2008; SHIVAKUMAR *et al.*, 2012).

Atualmente, no mercado nacional não existem medicamentos tópicos com alta eficácia para tratamento de onicomicoses. Diante deste problema e considerando a redução de custos para os serviços de saúde, este trabalho tem por objetivo desenvolver formulações ungueais (géis e termogéis) contendo ciclopirox olamina para tratamento de onicomicose e avaliar o desempenho dessas formulações por meio de estudos de permeação *ex vivo* utilizando unhas humanas como biomembrana, visando selecionar formulações que possam vir a ser disponíveis futuramente no mercado nacional e internacional e mais eficazes que aquelas disponíveis comercialmente.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Desenvolver e avaliar o desempenho de formulações ungueais simples, de baixo custo e mais eficazes que aquelas disponíveis comercialmente contendo ciclopirox olamina para tratamento de onicomicoses.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

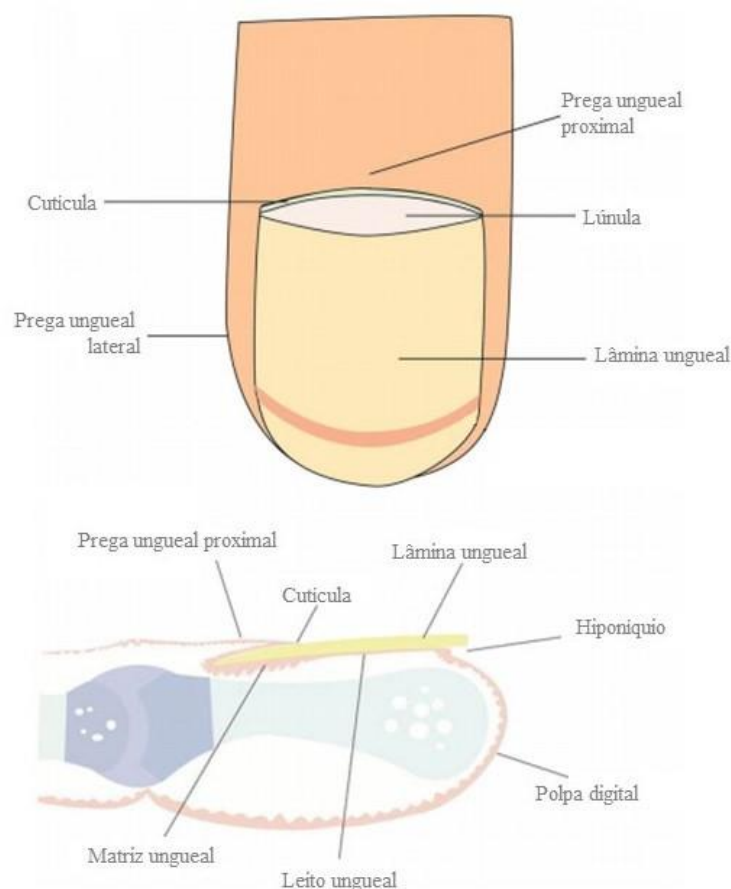
- Realizar revisão sistemática acerca de formulações tópicas contendo ciclopirox em estudos de permeação/retenção ungueal;
- Avaliar a solubilidade da ciclopirox olamina (CPO) em diferentes tensoativos, óleos e solventes;
- Desenvolver formulações ungueais contendo CPO;
- Realizar caracterização das formulações obtidas: pH, características organolépticas e doseamento do fármaco;
- Desenvolver e validar metodologia analítica por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE-DAD) para quantificação de CPO nas formulações em estudo e nos ensaios de liberação *in vitro* e permeação ungueal *ex vivo*;
- Realizar cinéticas de liberação *in vitro* de CPO a partir das formulações desenvolvidas e do produto comercial Micolamina® esmalte;
- Realizar a permeação *ex vivo* de CPO a partir das formulações desenvolvidas e do produto comercial Micolamina® esmalte, utilizando unhas humanas saudáveis lixadas e microporadas;
- Avaliar microscopicamente as unhas humanas saudáveis lixadas e microporadas;
- Avaliar a ação antifúngica das formulações finais contra o *Trichophyton rubrum*.

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 ESTRUTURA DA UNIDADE UNGUEAL

A unha é um anexo cutâneo localizado nas extremidades distais dos dedos, tem função de proteção, pinçamento e estética. É formada por camadas de células anucleadas ricas em queratina, o que lhe confere característica de placa e consistência rígida. A unidade ungueal é constituída de um conjunto de estruturas (Figura 1), sendo elas: dobra ou prega ungueal proximal e lateral, matriz, leito, lúnula, cutícula, hiponíquio (pele sob a borda livre da placa) e lâmina ungueal. O crescimento da lâmina se dá a partir da matriz, localizada na extremidade proximal dos dedos em direção a extremidade distal, sobrepõe-se ao leito ungueal e separa-se deste último no hiponíquio (LOPES BARBOSA *et al.*, 2013; MAGELA MAGALHÃES; BRASIL SUCCI; JEUNON SOUSA, 2003).

Figura 1 – Estruturas da unidade ungueal.



Fonte: Adaptado de (DE BERKER, 2013).

A lâmina ungueal é uma forma modificada de estrato córneo, fornecendo uma estrutura laminada queratinizada que recobre o leito e a matriz ungueal. A forma laminada é aparente quando examinada por histoquímica, ultrassom, tomografia de coerência óptica e microscopia eletrônica (ALUJA JARAMILLO *et al.*, 2017; FARREN; SHAYLER; ENNOS, 2004; MOGENSEN *et al.*, 2007). Se apresenta curva tanto no eixo longitudinal como no transversal, permitindo sua incorporação nas pregas proximal e lateral, fornecendo uma fixação forte e tornando a extremidade livre uma ferramenta útil (SHUSTER, 1996).

A taxa de crescimento da lâmina ungueal é geralmente medida simplesmente pelo alongamento longitudinal, usando a lúnula (“meia-lua” esbranquiçada geralmente vista no polegar) ou prega ungueal proximal como estrutura de referência. Apesar de simples, essa não é a medida mais precisa da produção da lâmina ungueal por unidade de tempo, que requer uma avaliação complexa da espessura ou massa da lâmina ungueal (MOFFITT; DE BERKER, 2000).

A lâmina ungueal humana é altamente ordenada, composta de três camadas distintas - a lâmina dorsal, a lâmina intermediária e uma camada ventral do leito ungueal. Pode ser caracterizada como uma estrutura fina, rígida, levemente elástica, translúcida e convexa. Formada por aproximadamente 80 a 90 camadas de células achatadas queratinizadas anucleadas. É composta de aproximadamente 80% de queratina, 10-30% de água e 0,1-1% de lipídios. Devido à presença de muitas pontes dissulfeto e de hidrogênio que interligam as fibras de queratina, a lâmina ungueal torna-se uma estrutura fortemente impermeável (ACHTEN; ANDRE; LAPORTE, 1991; CHOUHAN; SAINI, 2012; DE BERKER, 2013; MURDAN, 2002). Em geral, as unhas das mãos possuem entre $0,38 \pm 0,05$ mm a $0,63 \pm 0,10$ mm, enquanto as dos pés possuem aproximadamente de $0,72 \pm 0,20$ mm de espessura (ENDRINGER PINTO *et al.*, 2020; MOGENSEN *et al.*, 2007).

As dobras laterais são as margens laterais cutâneas da unha. Eles são tipicamente mais proeminentes nos dedos dos pés do que das mãos, e são essenciais para aderência firme da unha ao leito ungueal. Quando a dobra ungueal lateral está retraída, a lâmina ungueal torna-se mais propensa à onicólise (descolamento da lâmina ungueal do leito ungueal). Já se a massa de uma dobra ungueal lateral for excessiva e incompatível com a curvatura e o tamanho da lâmina, a incorporação normal geralmente evolui para encravamento patológico (DE BERKER, 2013).

A prega ungueal proximal (PUP) é a pele que se desenvolve por volta da 14ª semana do embrião. Ela é aderente à face dorsal da lâmina ungueal e esconde toda ou parte da matriz ungueal, que se manifesta clinicamente como a “lúnula”. Essa aderência à lâmina fornece uma camada protetora sobre a matriz, essa proteção também bloqueia a radiação ultravioleta (UV)

(STERN *et al.*, 2011). A matriz é o único local onde há melanócitos em funcionamento e tal proteção contra raios UV pode diminuir o risco de malignidade. Além disso, a PUP também se combina com a cutícula formando uma vedação contra substâncias exógenas que possam agredir a matriz e consequentemente comprometer o crescimento da lâmina (DE BERKER, 2013).

Outra estrutura importante para proteção da unidade ungueal é a cutícula, caracterizada como uma camada de epiderme que se estende da prega ungueal proximal e adere à face dorsal da lâmina ungueal. A retirada proposital, inflamação ou infecção podem resultar na perda de cutícula, que muitas vezes gera um quadro de paroníquia (infecção do tecido ao redor da unha) crônica (SHAFRITZ; COPPAGE, 2014). A perda de cutícula torna mais difícil para a PUP desempenhar seu papel de proteção. Os tecidos que ficam abaixo da lâmina ungueal são divididos em matriz (15-25%) e leito ungueal (75-85%). Clinicamente, o elemento distal da matriz é visível em alguns dedos como a lúnula (REARDON *et al.*, 1999).

O leito ungueal se estende da margem distal da lúnula até o hiponíquio. A retirada da unha mostra um padrão de sulcos epidérmicos longitudinais que se estendem até a lúnula. Os pequenos vasos do leito ungueal são orientados no mesmo eixo. Isso foi demonstrado pelo método de *corrosion casting* em dedos de cadáveres (SANGIORGI *et al.*, 2004).

Já em relação a vascularização do dedo, ela é feita por sistemas profundos e superficiais com microvasculatura complexa. O suprimento arterial corresponde ao sistema profundo enquanto as veias digitais dorsal e palmar existem superficialmente. O suprimento arterial dos dedos das mãos e dos pés é basicamente o mesmo. As artérias radial e ulnar suprem as arcadas palmares profundas e superficiais que atuam como grandes anastomoses entre os dois vasos. A região subungueal é suprida por arcadas subungueais distais e proximais, surgindo por sua vez de uma anastomose do arco palmar e do arco ungueal dorsal (DE BERKER, 2013; SANGIORGI *et al.*, 2004).

O suprimento arterial deficiente pode ter um efeito considerável na polpa do dedo e na unidade ungueal. Em um estudo não controlado, foi observado que a onicólise, as unhas finas e quebradiças e a descoloração eram atribuíveis à diminuição do fornecimento de sangue (SAMMAN; STRICKLAND, 1962).

As unhas humanas podem ser acometidas por diversas patologias, desde alteração de coloração a inflamações e infecções. No entanto, as lâminas ungueais são barreiras resistentes para a penetração de fármacos, limitando a passagem transungueal, o que dificulta a eficácia do tratamento tópico das doenças que acometem o leito ou a matriz ungueal (ELSAYED, 2015).

3.2 INFECÇÕES FÚNGICAS

A relação do ser humano com os fungos acontece desde a antiguidade, onde o homem se beneficia em alguns casos e em outros, pode sofrer consequências de uma infecção. O conhecimento sobre fungos e sua ação patogênica data de antes do estudo sobre bactérias. Conhecida como micologia médica, o estudo de fungos de interesse médico iniciou com os trabalhos de Robert Remark em 1837, ao descobrir o *Favus*, também denominado tinea favosa, que trata de uma infecção dermatofítica inflamatória crônica no couro cabeludo, geralmente causada por *Trichophyton schoenleinii* (DE BESARQUES, 1994; VERA; CERVERA, 2001).

Entretanto, os trabalhos de maior importância foram do médico húngaro, David Gruby, que classificou *Candida* no gênero *Sporotrichum*, apresentando o primeiro caso de candidíase frente à Academia de Ciências de Paris, na França (HAZEN, 1995) e de Berg, que em 1846 estudou detalhadamente a *Candida*, e estabeleceu, definitivamente, a sua relação com a candidíase oral (BERG, 1846). Em 1853, Charles Robin denominou esta levedura por *Oidium albicans*, que posteriormente foi chamada de *Monilia albicans*, para então somente ser denominada *Candida albicans*, do gênero *Candida*, em meados de 1923 por Berkhout, nome que permanece até os dias atuais (ARENAS, 2011; SIDRIM; ROCHA, 2004).

Até o início do século 20 a micologia médica ficou esquecida, e voltou a ter destaque com os estudos de Raymond Sabouraud, que realizou o cultivo *in vitro* de fungos patogênicos causadores de micose (SABOURAUD, 1910).

À medida que a medicina avançou, o número de infecções fúngicas cresceu em todo o mundo, isso ocorreu devido aos avanços na área de transplante de órgãos, quimioterapia em pacientes neoplásicos, aumento no uso de antibióticos e crescimento do número de pessoas imunossuprimidas, dessa forma, a infecção fúngica oportunista tornou-se um importante causa de morte em pacientes hospitalizados a partir da década de 90 (ANAISSE, 1992; PFALLER; WENZEL, 1992).

Embora seja difícil dimensionar as infecções fúngicas, permanece claro que aquelas que afetam a pele e a mucosa continuam a ser as mais importantes em termos de morbidade. Eles representam um dos problemas de saúde de maior alcance na população mundial de todas as idades, tendo sido comparados com a cárie dentária e o resfriado comum em termos de incidência e prevalência. Estima-se que 15 milhões de pessoas em todo o mundo sofram de micose do couro cabeludo, que na Inglaterra ocorrem 250.000 novos casos de dermatofitose a cada ano, e que a onicomicose, uma das infecções fúngicas com maior incidência no mundo, afeta aproximadamente 2% a 3% da população (EINARSON *et al.*, 1996; VERA; CERVERA,

2001). As infecções por fungos nas unhas afetam 3-8% da população do Reino Unido (AMEEN *et al.*, 2014; SHAHZAD *et al.*, 2014), cerca de 2-5 milhões de pessoas, e sua incidência em outros locais é tão alta quanto, 13,4% na América do Norte, 23% na Europa e 20% no Leste da Ásia (GHANNOUM, MAHMOUD; ISHAM, 2014; GUPTA, ADITYA K.; VERSTEEG, 2016; THOMAS, J. *et al.*, 2010).

Segundo estudo realizado com 7852 pacientes de diferentes regiões do país (CHIAICCHIO *et al.*, 2013), a ONC atinge cerca de 28,3% da população brasileira. Outros dados publicados na literatura mostram prevalências locais em alguns estados e cidades brasileiras, entre elas 68,4% na cidade de João Pessoa (DA SILVA PONTES *et al.*, 2002); 52% no estado do Ceará (BRILHANTE *et al.*, 2005) e 56,4% na cidade de Goiânia (SOUZA *et al.*, 2010). No entanto, faltam estudos mais atuais e abrangentes que expressem a prevalência desta infecção no território nacional.

Para avaliar a atividade e resistência antifúngica de fármacos no tratamento destas infecções, é necessário a realização de testes *in vitro* de forma padronizada. A organização que atualmente promove o desenvolvimento e o uso de padrões e diretrizes para um consenso laboratorial na comunidade de saúde é o *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI). A ANVISA por sua vez, realiza traduções oficiais dos guias que orientam a realização de testes padrões (CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (CLSI), [S.d.]).

A concentração mais baixa de um agente antimicrobiano que impede crescimento visível de um microorganismo no teste de sensibilidade por diluição em ágar ou caldo é definido como a Concentração Inibitória Mínima (CIM). O teste inicial que foi padronizado para determinação do CIM foi o de macrodiluição em caldo, posteriormente modificada para microdiluição, que mostrou excelente concordância entre os resultados obtidos. Atualmente o método de referência para determinação da sensibilidade à terapia antifúngica são os testes de diluição em caldo, disponíveis nos guias M27-A2 para leveduras e M38-A para fungos filamentosos (CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (CLSI), [S.d.]).

O apêndice I deste trabalho, apresenta uma tabela resultante da pesquisa na literatura, dos CIMs dos principais agentes utilizados para tratamento de onicomicoses.

3.3 ONICOMICOSE

A palavra "onicomicose" é derivada das palavras gregas *onyx*, que significa unha, e *mykes*, que significa fungo. A Onicomicose (ONC) é uma infecção fúngica da unha que pode atingir tanto unhas das mãos como dos pés. Quando causada por dermatófitos, é chamada de *tinea unguium*. Apesar da literatura sobre a epidemiologia da ONC ser muito variada, a maioria dos autores afirmam que esta infecção é responsável por 15 a 50% das doenças ungueais, onde 30% de todos os casos são dermatofitoses. Pode afetar um ou mais componentes do aparelho ungueal, incluindo a lâmina ungueal, a matriz e o leito ungueal (CHOUHAN; SAINI, 2012; FAERGEMANN; BARAN, 2003; MURTHY; MAIBACH, 2012; THOMAS, JACKSON *et al.*, 2019; ZAIAS, 1985).

Com base em 11 estudos de base populacional, a prevalência global média foi estimada em 3,6% (intervalo de confiança de 95%: 1,4% –5,8%) (SIGURGEIRSSON, B.; BARAN, 2014). No entanto, em 2017, a prevalência global de onicomicose foi estimada em 5,5% com base em estudos epidemiológicos publicados na época, estando dentro da faixa de estimativas relatadas anteriormente (2% –8%) (GUPTA, ADITYA K.; VERSTEEG; SHEAR, 2017a).

A ONC é tipicamente uma infecção crônica (duração em torno de 5 anos), além disso, as recidivas ocorrem frequentemente após a interrupção da terapia antifúngica (MONTI, DANIELA *et al.*, 2019a; ROSEN *et al.*, 2015). À medida que a infecção avança, a lâmina ungueal torna-se frágil e quebradiça e pode ocorrer a separação da lâmina ungueal do leito ungueal. É causada principalmente por dermatófitos (90%), sendo o *Trichophyton rubrum* (71%) o principal agente causal e, às vezes, por leveduras ou bolores (GUPTA, ADITYA K.; VERSTEEG; SHEAR, 2017a). Infecções por levedura do gênero *Candida* spp. (*Candida albicans* e/ou *Candida parapsilosis*) são responsáveis por 2% das onicomicoses, e 8% das infecções das unhas são causadas por fungos não dermatófitos, particularmente por *Scopulariopsis brevicaulis* (LEE, MYUNG HOON *et al.*, 2012; OBED MARTÍNEZ-HERRERA *et al.*, 2015).

Os fungos do gênero *Candida* e os não dermatófitos são responsáveis pela maioria dos casos de onicomicose em climas moderados, enquanto os dermatófitos causam a doença em climas quentes e úmidos (CHI; WANG; CHOU, 2005; WESTERBERG; VOYACK, 2013).

Quando o agente etiológico pertence aos gêneros *Fusarium* spp. e *Aspergillus* spp., os tratamentos padrão com terbinafina ou itraconazol que geralmente são aplicados para dermatófitos, não são eficazes. Nestes casos, o tratamento tópico com anfotericina B (solução

2mg/mL em mistura de DMSO e álcool isopropílico 1:1) tem se mostrado satisfatório (MONOD, MICHEL; MÉHUL, 2019).

Os efeitos da infecção podem incluir dor, infecções bacterianas secundárias, incapacidade de usar sapatos, baixa autoestima e constrangimento emocional devido à desfiguração das unhas afetadas (CHACON *et al.*, 2013; ELEWSKI, 2000; THOMAS, J. *et al.*, 2010).

3.3.1 Fatores de Risco e prevalência

Acredita-se que a ONC tenha se tornado mais prevalentes durante o século 20 devido à migração de pessoas, a maior expectativa de vida, aumento do número de pessoas com diabetes ou sistema imunológico comprometido (como portadores de HIV) e aumento do uso de calçados oclusivos (THOMAS, JACKSON *et al.*, 2019).

Os principais fatores de risco para ONC são: envelhecimento, diabetes, tinea pedis, psoríase, câncer, obesidade, imunodeficiência, natação, tabagismo, higiene inadequada e conviver com parentes com onicomicose (HANEKE; ROSEEUW, 1999; LIPNER; SCHER, 2019).

Tem-se observado um aumento da incidência da doença devido ao envelhecimento da população. A prevalência da ONC aumenta com a idade, afetando 20% a 50% dos maiores de 60 anos (THOMAS *et al.*, 2010; CHADEGANIPOUR; MOHAMMADI; SHADZI, 2016), enquanto a prevalência em crianças na América do Norte é de aproximadamente 0,4% (SOLÍS-ARIAS; GARCÍA-ROMERO, 2017), além do aumento no número de pacientes diabéticos que são 2,5 vezes mais propensas a desenvolver esta infecção fúngica (GUPTA; VERSTEEG, 2016; ROSEN *et al.*, 2015). As infecções fúngicas cutâneas, onde um terço são onicomicoses, estavam entre as 5 principais doenças de pele por custo médico direto em 2004 (BICKERS, *et al.*, 2006).

Embora a doença seja associada a condições extrínsecas, como imunossupressão, fatores ambientais, objetos ou superfícies contaminadas, (GARCÍA-ROMERO; ARENAS, 2015) forneceram evidências sobre predisposição familiar ou genética à infecção fúngica, mediada por imunidade inata e/ou adaptativa, mostrando que as pessoas são geneticamente suscetíveis a infecções por dermatófitos em um padrão autossômico dominante.

A prevalência de onicomicose é alta entre indivíduos com mais de 60 anos (HANEKE; ROSEEUW, 1999). Em um estudo prospectivo recente de pacientes com mais de 65 anos, infecções fúngicas foram a terceira queixa dermatológica mais comum (n = 240). É estimado um aumento da prevalência de onicomicose em paralelo ao envelhecimento da população (POLAT; İLHAN; POLAT, 2015).

A infecção em idosos, diabéticos e pacientes imunocomprometidos é particularmente preocupante, visto que uma vez não tratada, a ONC pode trazer complicações médicas e redução da qualidade de vida, como desconforto e dificuldade em caminhar, além de fornecer uma fonte para infecções secundárias nos pés, aumentando o risco de ulcerações que podem levar até casos de amputações (THOMAS *et al.*, 2010; GUPTA; VERSTEEG, 2016; ELEWSKI; TOSTI, 2014), gerando um aumento no custo para os sistemas de saúde.

Nos pacientes com imunossupressão, foi observado que a onicomicose expressa características mais intensas e que o agente fúngico pode se disseminar, causando uma doença sistêmica ou até fatal. Em pacientes portadores do vírus da imunodeficiência humana (HIV), a prevalência gira em torno de 23%, apesar de não haver relação significativa entre a carga viral e o desenvolvimento de onicomicose, os fatores de predisposição incluem uma contagem de células CD4 de aproximadamente 370 células/mm (GUPTA, ADITYA K. *et al.*, 2000).

Outros fatores epidemiológicos relacionados são profissões que envolvem contato frequente das unhas com água e solo podendo contribuir para o estabelecimento da onicomicose (ELLABIB *et al.*, 2002), além do uso de sapatos oclusivos e apertados, hiperidrose, participação em atividades esportivas, trauma nas unhas, tratamento anterior ineficaz das unhas, uso de piscinas de clube, banho comunitário e viver com familiares com infecção fúngica (LEUNG *et al.*, 2020).

3.3.2 Tipos de Onicomicose

Para que haja sucesso no tratamento, é importante que haja a correta classificação da doença. A infecção fúngica pode afetar toda lâmina ungueal ou parte dela, uma ou mais unhas, sendo dos pés e/ou das mãos e/ou de ambos, e é caracterizada macroscopicamente como: mudança de coloração, espessamento ou afinamento da lâmina, amolecimento e descolamento do leito ungueal. No entanto, de acordo com o padrão de acometimento da unha, existe uma classificação que também é correlacionada com o fungo causador da injúria. O diagnóstico absoluto não é feito clinicamente, é necessário que seja realizado exame micológico (microscópico direto e cultura (ELLIS, 1999; HAY; BARAN, 2011).

Diante do exposto, é possível destacar a atual classificação em cinco formas: onicomicose subungueal distal e lateral (OSDL), onicomicose superficial (OS), onicomicose subungueal proximal (OSP), onicomicose endoníaca (OE) e onicomicose distrófica total (ODT) (HAY, BARAN, 2011). Existe também a onicomicose de padrão misto, onde diferentes padrões de infecção da lâmina ungueal podem ser observados no mesmo indivíduo.

3.3.2.1 Onicomicose subungueal distal e lateral (OSDL)

O subtipo clínico mais comum de onicomicose é a onicomicose subungueal distal e lateral, onde o local de invasão fúngica é a partir da superfície inferior lateral ou distal da lâmina ungueal (Figura 2). É caracterizada com a presença de onicólise com hiperqueratose e várias formas de despigmentação. Mais comumente, é branco ou amarelado, mas já foram relatadas outras mudanças de cor, como descoloração de marrom, preto e laranja. O *T. rubrum* é o principal agente etiológico encontrado neste tipo de ONC (HAY; BARAN, 2011; LEE, SANG WON *et al.*, 2004).

Figura 2 – Onicomicose subungueal distal e lateral.



Fonte: (HAY; BARAN, 2011).

OSDL está associada a uma variedade de fungos diferentes. Essa forma de invasão da lâmina ungueal pode ser complicada por outras alterações fisiopatológicas, em alguns casos está associado às estrias longitudinais da unha, chamadas de dermatofitoma, que também podem ser observadas em outros tipos de onicomicose, mas são mais comuns na OSDL. Pode atingir somente a borda lateral da unha ou qualquer outra parte da placa ungueal. No entanto, está associada à presença de queratina esponjosa subjacente, frequentemente infiltrada por fungos ou bactérias, e a falha do tratamento é comum, a menos que a área seja excisada. A onicólise, que é o descolamento da unha do leito ungueal, é ocasionalmente a única anormalidade física associada à invasão da lâmina ungueal distal e lateral (HAY; BARAN, 2011; ROBERTS; EVANS, 1998).

3.3.2.2 Onicomicose superficial (OS)

Comumente chamada de onicomicose superficial branca (Figura 3), sabe-se que ela pode se apresentar com uma variedade de cores dependendo do organismo envolvido, portanto, o uso do termo "onicomicose superficial" é mais adequado.

Em geral, a infecção inicia na camada superficial da lâmina ungueal e se espalha para as camadas mais profundas. Em maior parte, as lesões se mostram brancas esfareladas na superfície das unhas, particularmente nas unhas dos pés. Estes se espalham gradualmente até atingir toda a lâmina ungueal. Algumas formas de infecção superficial surgem como bandas lineares da prega ungueal proximal, e em alguns casos acometem a unha de forma profunda. Nenhum deles responde bem à terapia tópica (AMEEN *et al.*, 2014).

Figura 3 – Onicomicose superficial branca.



Fonte: (HAY; BARAN, 2011).

3.3.2.3 Onicomicose subungueal proximal (OSP)

Este tipo de onicomicose geralmente se origina na prega ungueal proximal, com subsequente penetração na lâmina ungueal recém-formada, ou abaixo da lâmina ungueal proximal. A porção distal da unha permanece normal. A maioria dos casos de OSP (figura 4) atingem as unhas dos pés, onde o agente etiológico mais comum é o *T. rubrum*.

Na população imunocompetente, a OSP é uma infecção ungueal por dermatófitos rara, porém é frequente em pessoas com AIDS, sendo as vezes, considerada como marcador da infecção por HIV (AMEEN *et al.*, 2014).

Figura 4 – Onicomicose subungueal proximal.



Fonte: (HAY; BARAN, 2011).

3.3.2.4 Onicomicose endoníaca (OE)

Nesse tipo de infecção, em vez de invadir o leito ungueal através da margem da lâmina, o fungo penetra diretamente na queratina da lâmina ungueal, a superfície da unha tende a se fragmentar, apresenta coloração escura, e o espessamento é quase inexistente (Figura 5). Na onicomicose endônica, os organismos causadores mais comuns são *T. soudanense* e *T. violaceum* (AMEEN *et al.*, 2014).

Figura 5 – Onicomicose endoníaca.



Fonte: (HAY; BARAN, 2011).

3.3.2.5 Onicomicose distrófica total (ODT)

Qualquer um dos tipos de onicomicose citados acima pode eventualmente progredir para um quadro de onicomicose distrófica total (Figura 6), sendo um quadro clínico secundário, onde a lâmina ungueal é quase completamente destruída, e o leito ungueal fica mais espesso e sulcado e geralmente coberto com detritos. Pode levar de 10 a 15 anos para desenvolver.

A ODT de causa primária é rara e geralmente é causado por espécies de *Candida*, afetando principalmente pacientes imunocomprometidos. Não é apenas o estágio mais difícil de tratar, mas também o tipo com maior risco de desenvolver ulcerações subungueais, infecção bacteriana secundária e gangrena em pacientes com circulação periférica prejudicada (AMEEN *et al.*, 2014; HAY; BARAN, 2011; “Onychomycosis - StatPearls - NCBI Bookshelf”, [S.d.]

Figura 6 – Onicomicose distrófica total.



Fonte: (HAY; BARAN, 2011).

Além desses, outro tipo de onicomicose ocasionada pela levedura *Candida* possui quatro características clínicas distintas como: presença de paroníquia (infecção do tecido ao redor da unha) crônica com distrofia, candidíase crônica mucocutânea, onicólise distal. A contaminação por *Candida spp.* nas unhas são comumente relacionadas a uso de corticóides, pessoas imunossuprimidas, imunocomprometidas e insuficiência vascular periférica (AMEEN *et al.*, 2014).

Além das alterações morfológicas da lâmina ungueal, que pode ser permanente ou não, a infecção fúngica nas unhas podem causar dor, afetar o indivíduo de forma emocional e socialmente, e originar infecções secundárias por bactérias. A infecção pode se propagar facilmente para outras unhas, e contaminar outras pessoas pelo uso inadequado de objetos como: tesouras, alicates e lixas de unha (GELOTAR *et al.*, 2013).

3.3.3 Diagnóstico laboratorial das onicomicoses

Antes de tratar a onicomiose, é importante confirmar o diagnóstico, visto que vários outros processos patológicos podem mimetizar a onicomiose, incluindo onicogrifose (unhas espessas), psoríase, distrofia traumática e líquen plano (ARRESE; PIÉRARD-FRANCHIMONT; PIÉRARD, 1999). A confirmação é fundamental para evitar falhas no tratamento, diagnósticos incorretos, efeitos colaterais desnecessários e potenciais interações medicamentosas (LIPNER; SCHER, 2016a).

As características clínicas de unhas distróficas devem alertar para a possibilidade de onicomiose, mas qualquer tipo de tratamento só deve ser iniciado após confirmação laboratorial. Isso impede um diagnóstico equivocado, além de detectar infecções mistas, e identificar se o paciente apresenta infecção com formas menos responsivas.

A confirmação laboratorial pode ser feita através do exame micológico direto, cultura fúngica, exame histopatológico e biologia molecular, de diferentes partes das unhas afetadas (a amostra depende do caso clínico). O material deve ser colhido de todas as partes que apresentam alteração de cor, distrofia ou estejam quebradiças. Quando há acometimento superficial, a raspagem das unhas pode ser feita com uma cureta (AMEEN *et al.*, 2014; GUPTA, ADITYA K.; VERSTEEG; SHEAR, 2017a).

De acordo com a Sociedade Brasileira de Dermatologia (SBD), o exame micológico é a primeira etapa do diagnóstico laboratorial, requer recursos humanos especializados e indica se contém ou não estruturas fúngicas que são avaliadas quanto à morfologia e coloração. O exame é realizado após a clarificação das escamas com solução aquosa de hidróxido de potássio e dimetil sulfoxido.

Já a cultura fúngica, padrão ouro de diagnóstico, é necessária para isolar e identificar a espécie, devendo o material ser inoculado sempre em diferentes meios, por exemplo, o ágar Sabouraud simples, o ágar Sabouraud com ciclo-heximida, que inibe o crescimento de fungos contaminantes, o ágar Sabouraud com cloranfenicol, que tem por finalidade inibir o crescimento de bactérias, entre outros (DE ARAÚJO *et al.*, 2003). Uma limitação do teste é o tempo que leva para obter resultados (até duas semanas). Outra técnica de diagnóstico utilizada é a análise histopatológica usando coloração de ácido periódico-Schif (REISBERGER *et al.*, 2003). É importante salientar que na coleta do material o paciente deve estar sem uso de antifúngico tópico há uma semana e/ou antifúngico sistêmico há dois meses.

Nos últimos anos, novas técnicas de diagnóstico foram desenvolvidas usando ferramentas de genética molecular para diagnosticar dermatófitos, espécies de *Candida* e fungos não dermatofíticos. Ensaios de reação em cadeia da polimerase em tempo real (RT-PCR) foram desenvolvidos como técnica de detecção e identificação simultânea dos dermatófitos mais prevalentes em amostras de unha, pele e cabelo, além de ter um tempo de resposta rápido, em média 24 horas (MONOD, MICHEL *et al.*, 2006).

A prevalência de fungos filamentosos não dermatófitos (FFND) na onicomicose foi estimada em aproximadamente 20% dos casos a partir da identificação por PCR (MONOD, MICHEL *et al.*, 2006; VERRIER *et al.*, 2012). Já a prevalência fornecida a partir do diagnóstico por cultura variam amplamente na literatura de 3% a 80% (SCHERER; MCCREARY; HAYES, 2001). No que trata da cultura fúngica, frequentemente é difícil distinguir se a presença de fungos é oriunda da infecção ou de contaminação. No entanto, a técnica de PCR se mostra confiável e adequada para realizar a identificação *in situ* de dermatófitos, leveduras e FFNDs em onicomicoses (MONOD, MICHEL; MÉHUL, 2019; VERRIER; MONOD, 2017).

Por fim, os métodos imunológicos são outra tendência atual na detecção da onicomicose. Foi produzido um anticorpo monoclonal anti-dermatófito que reage com o antígeno polissacarídeo da parede celular dos dermatófitos (NORIKI; ISHIDA, 2016). A partir do uso deste anticorpo com a imunocromatografia, tiras de teste foram desenvolvidas, validadas (H; M, 2016; HIGASHI *et al.*, 2012; TSUNEMI; HIRUMA, 2016) e estão disponíveis como novos dispositivos (Tira de teste de dermatófito, JNC Corporation, Tóquio, Japão; FungiCheck, HFL Laboratories, Holanda – Figura 7).

Figura 7 – Tira de teste imunocromatográfico de dermatófito FungiCheck, HFL Laboratories, Holanda.



Fonte: <https://www.fungicheck.com/>.

A tabela 1 (MONOD, MICHEL; MÉHUL, 2019) traz um resumo dos métodos utilizados para o diagnóstico de onicomicose e rápida identificação do patógeno na França. Esta, porém, não é uma realidade quando se trata de Brasil.

Tabela 1 – Resumo dos métodos usados para diagnóstico de onicomicose.

Método	Alvo	Uso	Tempo de Resultado	Especificidade	Referência
Exame micológico direto	Hifas e esporos nas unhas	PP,RL	2-5 min	Fungos (<i>Trichophyton</i> , FFNDs, Leveduras)	(MONOD, M. <i>et al.</i> , 1989)
Cultura	Crescimento fúngico	RL	7-14 dias	<i>T. rubrum</i> , <i>T. interdigitale</i> , FFNDs e leveduras	(EENGLIS H, 1976)
PCR	DNA fúngico	RL	5 horas	<i>Trichophyton</i> , FFNDs, Leveduras	(MONOD, MICHEL <i>et al.</i> , 2006; VERRIER; MONOD, 2017)
Espectrometria de massas	Sub6	PD	24 horas	<i>T. rubrum</i> e <i>T. interdigitale</i>	(MÉHUL <i>et al.</i> , 2016)
Western Blotting	Sub6	PD	-	<i>Trichophyton</i>	(MÉHUL <i>et al.</i> , 2019)
ELISA	Sub6	-	24 horas	<i>Trichophyton</i>	(MÉHUL <i>et al.</i> , 2019)
Tira de teste imunocromatográfico	Polissacarídeos	PP	15 min	<i>Trichophyton</i>	(H; M, 2016; HIGASHI <i>et al.</i> , 2012; TSUNEMI; HIRUMA, 2016)

PP: uso no sistema particular privado; RL: uso em laboratório de rotina; PD: uso para pesquisa e desenvolvimento. FFNDs: fungos filamentosos não dermatófitos. Sub6: protease secretada por *T. rubrum* e *T. interdigitale* durante a infecção.

Fonte: Adaptado de (MONOD, MICHEL; MÉHUL, 2019).

3.3.4 Tratamento da onicomicose

O tratamento das onicomicoses está baseada em três segmentos terapêuticos: medicamentos tópicos, medicamentos sistêmicos e remoção mecânica ou química da lâmina ungueal. Terapia combinada (medicamentos orais + tópicos) também é utilizada e tem demonstrado benefícios clínicos e econômicos. A escolha do seguimento terapêutico varia de acordo com os sinais clínicos do paciente, tipo de infecção e comprometimento da unha (LECHA, MARIO *et al.*, 2002).

O objetivo final da terapia antifúngica difere de acordo com a perspectiva, os pacientes procuram uma unha de aparência saudável, enquanto os médicos buscam erradicar o fungo causador e impedir uma recidiva (objetivo à longo prazo e que necessita de total adesão do paciente ao tratamento). A adesão geralmente depende da conveniência do tratamento, principalmente em relação à posologia e administração, e dos possíveis efeitos adversos. Além disso, os pacientes costumam interromper o uso do antifúngico logo no momento que percebem uma melhora visual na(s) unha(s) afeta(s), o que possibilita restabelecimento da infecção fúngica (LECHA, M. *et al.*, 2005).

A recorrência da infecção é comum após o tratamento da onicomicose (20–25%) (PIRACCINI; SISTI; TOSTI, 2010; SCHER; BARAN, 2003) e geralmente ocorre dentro de 3 anos após o término da terapia. As recidivas geralmente são decorrentes de infecção persistente após cura incompleta, e/ou reinfecção, ou seja, outra infecção após cura completa (GUPTA, ADITYA K.; COOPER; PAQUET, 2013; SIGURGEIRSSON, BÁROUR *et al.*, 2002)

3.3.4.1 Tratamento oral

Fármacos para uso sistêmico, entre eles a terbinafina, itraconazol e fluconazol são recomendados para onicomicose moderada e grave, nos casos em que a matriz ungueal está envolvida. Em contrapartida, podem resultar em interações medicamentosas, e risco aumentado de hepatotoxicidade e insuficiência cardíaca congestiva (RICH; TOSTI; SCHER, 2013). Embora raros, foram relatados níveis elevados de aminotransferase sérica e lesão hepática em pacientes em tratamento oral para onicomicose. Se houver algum sinal de lesão hepática, o tratamento deve ser descontinuado (GUPTA, ADITYA K.; VERSTEEG; SHEAR, 2017a).

Agentes orais podem ser contraindicados em pacientes em polifarmácia como idosos, imunocomprometidos, pacientes em diálise e transplantados, pois as interações

medicamentosas com terapias antifúngicas podem provocar interações sinérgicas e/ou antagônicas (JOHNSON *et al.*, 2004).

Apesar da terapia sistêmica apresentar riscos de interações medicamentosas, e efeitos colaterais associados, ela é mais eficaz e indicada nos casos de ONC em que a matriz ungueal também está afetada pela infecção. No Brasil, os fármacos indicados pela Sociedade Brasileira de Dermatologia são a Griseofulvina (GRV), Terbinafina (TBF), Itraconazol (ITZ) e Fluconazol (FLZ). A tabela abaixo, retirada do Manual de conduta nas onicomicoses diagnóstico e tratamento, da Sociedade Brasileira de Dermatologia, criado após 2005 (sem data especificada do documento), apresenta a indicação das doses e duração de tratamento da onicomicose em unhas das mãos e dos pés.

Tabela 2 – Dose e duração dos tratamentos sistêmicos.

Tratamento sistêmico – Unhas das mãos		
Fármaco	Dose	Duração
ITZ	200mg/d	6-12 semanas
ITZ	400mg dia/7d/mês	2-3 pulsos
TBF	250mg/d	6-12 semanas
TBF	500mg dia/7d/mês	2-3 pulsos
FLZ	150mg/semana	Até cura clínica
GRV	500 – 1000mg	Até cura clínica
Tratamento sistêmico – Unhas dos pés		
ITZ	200mg/d	12-24 semanas
ITZ	400mg dia/7d/mês	3-6 pulsos
TBF	250mg/d	12-24 semanas
TBF	500mg dia/7d/mês	3-6 pulsos
FLZ	150-300mg/semana	Até cura clínica
GRV	500 – 1000mg	Até cura clínica

ITZ: Itraconazol. TBF: Terbinafina. FLZ: Fluconazol. GRV: Griseofulvina.

Fonte: Adaptado do Manual de conduta nas onicomicoses (RUIZ; CHIACCHIO, 2005).

A terbinafina e o itraconazol foram aprovados pelo Health Canada, FDA, ANVISA, para tratar onicomicose causada por dermatófitos, com taxa de cura completa de 46% e 21% a 22%, e taxa de cura micológica de 60% e 63% a 69% respectivamente (GUPTA, ADITYA K.;

KONNIKOV; LYNDE, 2001; GUPTA, ADITYA K.; VERSTEEG; SHEAR, 2017a; HAVU *et al.*, 1997; MADDIN; QUIRING; BULGER, 2013).

O fluconazol é aprovado para ONC na Europa. No entanto, possui uso *off label* nos USA, Canadá e Austrália (LIPNER, 2019). No Brasil, as bulas dos medicamentos com este fármaco, trazem a indicação para tratamento da ONC, e apresenta cura completa e taxas de cura micológica comparáveis ao itraconazol, 20% e 55% a 59%, respectivamente (“[BULA] FLUCOCIN® (fluconazol) EMS S/A Cápsula dura 150 mg”, [S.d.]; GUPTA, ADITYA K.; VERSTEEG; SHEAR, 2017a; HAVU *et al.*, 2000).

A griseofulvina foi prescrita sistematicamente para tratamento de ONC entre 1950 e início de 1960. No entanto, mesmo sendo ainda aprovada pelo FDA para esta finalidade, é raramente usada por existirem outros medicamentos aprovados para esta finalidade, com menores efeitos colaterais. (LIPNER, 2019). No Brasil, atualmente, não existe nenhum medicamento registrado contendo a griseofulvina, apesar de ter uso indicado para crianças com onicomicose (AMEEN *et al.*, 2014; DAVIES; EVERALL; HAMILTON, 1967). No entanto, este fármaco pode ser manipulado em farmácias magistrais brasileiras, sendo as formas farmacêuticas cápsulas e xarope, as mais comuns.

O cetoconazol foi usado para tratar a onicomicose a partir de 1981, com melhor absorção e tempo de tratamento mais curto em comparação com a griseofulvina. Atualmente é também raramente prescrito, devido ao risco aumentado de efeitos colaterais hepáticos graves (GUPTA, ADITYA K.; RYDER, 2003).

Os triazóis de segunda geração (voriconazol, posaconazol, ravuconazol, albaconazol, pramiconazol) têm atividade antifúngica de amplo espectro, particularmente para leveduras e fungos não dermatófitos. Eles têm um perfil de segurança aprimorado e menos interações medicamentosas do que os triazóis de primeira geração. Os ensaios clínicos que avaliam sua eficácia para onicomicose são atualmente limitados ou em andamento. Seu uso é limitado pelo alto custo e, até o momento, são utilizados principalmente para o tratamento de infecções fúngicas oportunistas invasivas, e em imunocomprometidos (AMEEN *et al.*, 2014).

Novos fármacos para terapia oral estão sendo testados para tratamento da ONC. O Etanolato de L-lisina de fosravuconazol, é um triazol e pró-fármaco do ravuconazol. Em um ensaio clínico duplo-cego randomizado para onicomicose de unha (n = 153), foi administrado diariamente o fármaco e o placebo durante 12 semanas. Como resultado, na semana 48 as taxas de cura completa (59,4% vs. 5,8%) e micológica (82% vs. 20%) foram significativamente maiores que o placebo (WATANABE; TSUBOUCHI; OKUBO, 2018).

3.3.4.2 Tratamento tópico

O tratamento tópico é recomendado em casos de ONC leve a moderada (até 60% da lâmina ungueal comprometida) ou quando os agentes orais são contraindicados (GUPTA, ADITYA K.; STUDHOLME, 2016). Como principal vantagem está a ausência de efeitos colaterais sistêmicos. Apesar de novos agentes estarem disponíveis com objetivo de melhorar a penetração na unidade ungueal, a fim de aumentar a eficácia, as taxas de cura com monoterapia tópica se apresentam menores do que aquelas com terapia antifúngica sistêmica. O fármaco ideal para o tratamento tópico deve ter penetração efetiva e em altas concentrações na lâmina ungueal (BOHN; KRAEMER, 2000; FINCH; WARSHAW, 2007; LECHA, M. *et al.*, 2005). Isto portanto, não depende exclusivamente das características do fármaco, mas também das características dos componentes presentes na forma farmacêutica onde ele se encontra veiculado.

Neste contexto, os esmaltes medicinais atuais possuem uma grande limitação oriunda da formulação, que é tipicamente baseada no uso de solventes orgânicos que evaporam após aplicação, deixando na placa ungueal o fármaco cristalizado que é incapaz de particionar ou difundir para o leito ungueal. Diante disto, segundo Lipner (2019) o uso desses esmaltes deveria ser evitado como terapia tópica devido ao desconhecimento da real eficácia.

A terapia tópica requer tratamento mais longo (geralmente 48 semanas) e em geral é menos eficaz que o tratamento oral, possivelmente devido a baixa penetração do ativo na placa ungueal (LEUNG *et al.*, 2020).

Os fármacos aplicados topicamente no tratamento de onicomicoses são: amorolfina 5%, ciclopirox 8%, tioconazol 28% (LECHA, M. *et al.*, 2005), tavaborol 5%, efinaconazol 10%, terbinafina 10% (LEUNG *et al.*, 2020), econazol 5% luliconazol 1%, este último ainda sob patente.

Tavaborol (solução) é uma terapia tópica recém-aprovada pelo FDA para onicomicose causada por *T. rubrum* ou *T. mentagrophytes*. O efinaconazol (solução) também foi aprovado pela FDA e pela Health Canada em 2014 para o tratamento de onicomicose causada por *T. rubrum* e *T. mentagrophytes*. Em vários ensaios clínicos de fase III, o efinaconazol atingiu taxas de cura completa e de cura micológica entre 15% e 18% e de 53% a 55%, respectivamente (ELEWSKI *et al.*, 2013; GUPTA; SIMPSON, 2014; GUPTA; VERSTEEG; SHEAR, 2017a).

Tioconazol é um agente antifúngico de amplo espectro indicado para tratamento tópico de onicomicose em solução a 28%, disponível na Europa e no Canadá (Trosyl®, Trosid®).

Hay; Mackie; Clayton (1985) investigaram a eficácia da aplicação tópica dessa solução em 27 pacientes com onicomicose por até 12 meses e alcançaram 22% de taxa de cura completa.

Em estudo multicêntrico, duplo-cego e randomizado de fase III conduzido em pacientes japoneses com onicomicose subungueal lateral distal, a taxa de cura completa para o luliconazol solução a 5%, aplicado uma vez ao dia por 48 semanas, foi de 14,9% versus 5,1 para o veículo e a taxa de cura micológica foi de 45,4% (WATANABE; KISHIDA; OKUBO, 2017). Já em estudo mais recente, a taxa de cura completa foi de 33,3% em tratamento de 11,9 meses de duração, aplicando solução de luliconazol a 5% (SHIMOYAMA; KUWANO; SEI, 2019).

Em relação ao econazol para uso ungueal no tratamento da onicomicose, foi desenvolvido um esmalte chamado Econail®, contendo 5% de econazol associado a 18% de 2-n-nonil-1,3-dioxolano (SEPA), um composto usado para promover a penetração do fármaco nas unhas (HUI *et al.*, 2003). Um registro na literatura foi encontrado, onde o fabricante indica que os estudos clínicos de fase I foram realizados, e que os de fase II iriam iniciar em abril de 2007 (MACROCHEM (MACM.OB), [S.d.]).

Estudos demonstram que a amorolfina 5% (POLAK, 1993) e o ciclopirox 8% (BOHN; KRAEMER, 2000) ambos na forma farmacêutica esmalte atravessam a lâmina ungueal conseguindo atingir o leito ungueal em concentrações superiores à concentração inibitória mínima (CIM) para a maioria dos fungos que causam onicomicose. Já o ciclopirox está indicado contra dermatófitos, *Candida* spp, e alguns fungos filamentosos não dermatófitos. Pode ser encontrado no mercado internacional na forma de esmalte convencional e esmalte hidrofílico (LEUNG *et al.*, 2020; MALAY *et al.*, 2009).

A amorolfina (não aprovada pelo FDA para uso nos EUA) age contra dermatófitos, leveduras e fungos filamentosos não dermatófitos, atinge duas enzimas envolvidas na biossíntese do ergosterol, modificando a morfologia da hifa, atuando como fungicida e fungistática (BOHN; KRAEMER, 2000; MULLER; POLAK-WYSS; MELCHINGER, 1992).

O Lamisil (terbinafina 1%) nas três apresentações (solução, spray e creme) são os únicos produtos industrializados para uso tópico no tratamento de pé de atleta (fungo) contendo este fármaco. Apesar da terbinafina ter potencial terapêutico para veiculação tópica e ter formulações desenvolvidas e descritas na literatura, nenhum produto tópico está registrado e disponível atualmente no mercado à base de terbinafina direcionado para uso ungueal no tratamento de onicomicose.

Para o tratamento de ONC, Thatai; Sapra (2018) desenvolveram um esmalte de terbinafina que mostrou maior penetração (~3,25 vezes) e retenção (~11 vezes) em casco animal em comparação com a formulação comercial testada (creme). A terbinafina também foi

veiculada em Transfersome®, os dados pré-clínicos dessa formulação sugerem que o Transfersome® acelera a entrada da terbinafina liberada da formulação nos fungos e potencializa seus efeitos antifúngicos, resultando em maior atividade, em comparação com a terbinafina spray. Em um estudo administrando a formulação duas vezes ao dia por 12 semanas em pacientes com onicomicose foi verificado altas taxas de cura micológica evidenciando o efeito clínico dessa preparação (SIGURGEIRSSON, BÁRDUR; GHANNOUM, 2012). P-3058 também é uma nova preparação tópica de terbinafina a 10%, que está sendo testado em um ensaio randomizado de fase 3 para avaliar a segurança e eficácia de P-3058 no tratamento de onicomicose subungueal distal e lateral nas unhas dos pés quando administrado uma vez semanalmente por 48 semanas (CASERINI, 2018). Outra formulação tópica de terbinafina é MOB-015 que recentemente atingiu cura micológica de 70% e cura completa de 4,5% na semana 52 em um estudo randomizado de fase 3 (MOBERG PHARMA AB, 2019).

No Brasil, a Sociedade Brasileira de Dermatologia (SBD) indica o uso de esmalte de amorolfina 5%; esmalte de ciclopírox 8% e solução de tioconazol 28% para terapia tópica nos casos em que a infecção não atinge a matriz ungueal, como na onicomicose superficial, quando há contraindicação do tratamento sistêmico, e na profilaxia pós-tratamento. No entanto, apesar da SBD indicar o uso de tioconazol solução a 28%, este produto não está disponível no mercado nacional (RUIZ, L. R. B.; CHIACCHIO, N. DI., [s.d.]).

Além destas formulações citadas, nas farmácias de magistrais brasileiras, é possível manipular algumas formulações indicadas para onicomicose, mediante prescrição. No entanto, nestes locais também é possível encontrar produtos de fabricação própria vendidos diretamente no balcão contendo diferentes antifúngicos em diferentes concentrações como mostrado na figura abaixo.

Figura 8 – Diferentes esmaltes de fabricação própria encontrados em farmácias de manipulação.



Fonte: <https://www.centralmanipulados.com.br/beleza/unhas/fluconazol-1-terbinafina-1-esmalte-antifungico-tratamento-de-micose-de-unhas> / <https://www.oficialfarma.com.br/esmalte-antimicotico-5ml/p> / <https://www.farmaciaeficacia.com.br/fluconazol-terbinafina/>

Outro produto disponível no mercado nacional é o Clotrimix, notificado na ANVISA como cosmético (isento de registro), sob a apresentação de base fortalecedora. Este produto apresenta em sua composição uma associação entre o clotrimazol e óleos essenciais. Na tabela abaixo estão descritos os medicamentos regularizados e comercializados no Brasil para tratamento de ONC e as principais informação quanto ao fabricante, composição, modo de uso, duração de tratamento, indicação de bula e populações especiais.

Tabela 3 – Medicamentos tópicos comercializados no Brasil para tratamento de ONC.

Fármaco/ concentração/for ma farmacêutica	Nome comercial	Fabricante	Composição	Modo de uso	Duração do tratamento	Indicação da bula	Populações especiais
Ciclopirox 8% Esmalte	Fungiroid®	UCI- Farma	Acetato de etila, álcool isopropílico, polímero avalure AC 375	Lixar unhas / limpar / aplicar 1º mês: dias alternados 2º mês: 2x semana 3º mês: 1x semana	Mãos: 6 meses / Pés: 9 a 12 meses	Tratamento de infecções fúngicas das unhas.	Não há advertências e recomendações especiais para idosos.
	Micolamina®	TheraSkin	Álcool isopropílico, acetato de etila, polimetacrílicoocopolíacrilato e dimetilsulfóxido				Não é indicado para uso em crianças (falta de dados suficientes).
Amorolfina 5% Esmalte	Loceryl®	Galderma	Copolímero de ácido metacrílico, triacetina, acetato de butila, acetato de etila e álcool etílico.	Lixar unhas / limpar / aplicar Uma vez por semana	Mãos: 6 meses / Pés: 9 a 12 meses	Tratamento de micoses de unha (onicomico- ses).	Não deve ser utilizado em crianças.
	Onicoryl®	Germes	Copolímero de acrilato de etila, metacrilato de cloreto de etil trimetilamônio e metacrilato de metila, triacetina, acetato de etila, acetato de butila e álcool etílico				Não há dados adequados sobre o uso de amorolfina em mulheres grávidas
	Dermoceryl®	EMS					
	Lomytrat®	Legrand					
	Onimorf®	Nova Química					
	Onicoryl®	Germes					
	Morofin®*	Abbott					
Unha sana®*	Kley Hertz						

*registrados no site da ANVISA, mas não disponíveis no site dos fabricantes, nem encontrados em busca rápida pelo google.

Fonte: a autora.

Independentemente da terapia (oral e/ou tópica), se uma unha inteira for afetada pela infecção fúngica e o tratamento for bem-sucedido, considerando a taxa média de crescimento ungueal, esta unha levará aproximadamente 6 meses para está completamente saudável. Este processo é ainda mais demorado para as unhas dos pés (em torno de 12 a 18 meses (LIPNER; SCHER, 2016b)).

Por fim, a retirada cirúrgica total da unha está em desuso, pois pode deixar a unha distrófica temporária ou permanentemente, gerando traumas à matriz ungueal. No entanto, a retirada parcial pode ser feita por meio da remoção da área afetada apenas (RUIZ; CHIACCHIO, 2005).

3.3.4.2.1 *Ciclopirox Olamina*

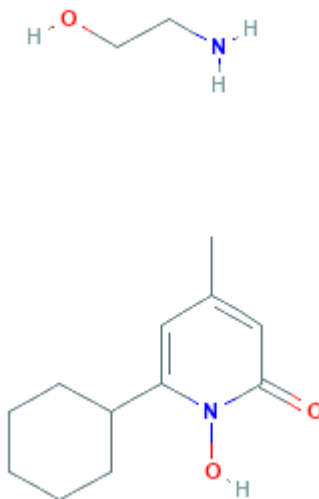
Ciclopirox olamina (CPO) é o sal de etanolamina de ciclopirox, de nomenclatura química 2-aminoetanol sal do 6-ciclohexil-1-hidroxi-4-metil-2-piridona (LOHAUS; DITTMAR, 1981), que foi relatada pela primeira vez como agente antifúngico em 1973 (originalmente chamada HOE 296) (NIEWERTH *et al.*, 2003), apresenta amplo espectro de ação contra diversos dermatófitos, leveduras e fungos clinicamente relevantes, sendo um agente fungicida e fungistático e, adicionalmente, demonstra atividades antibacterianas e anti-inflamatórias, mostrando-se útil para dermatoses superficiais, que estão associadas à infecção bacteriana e inflamação (DITTMAR *et al.*, 1981; GUPTA, ADITYA K; PLOTT, 2004).

O Ciclopirox olamina é um fármaco derivado da hidroxipiridona, que possui estrutura química (Figura 9) e mecanismo de ação diferente dos demais ativos antifúngicos (GUPTA, ADITYA K; SKINNER HBSC, 2003), ciclopirox olamina 1% é equivalente a 0,77% da forma de ácido livre (ciclopirox 0,77%), e a olamina não possui efeito antifúngico (GUPTA, A. K., 2001). Apresenta forma cristalina branco-amarelada, possui fórmula molecular $C_{14}H_{24}N_2O_3$, peso molecular de 268, 35 g/mol, ponto de fusão característico de 143°C, pKa de 6,84 e LogP de 2,22 (DRUGBANK; PUBCHEM, 2021).

Segundo Täuber; Müller-Goymann (2015), à 32°C o CPO apresenta solubilidade em água e em tampão PBS de $21,21 \pm 0,26$ mg/mL e $22,98 \pm 0,13$ mg/mL, respectivamente. Corroborando com o resultado anterior, Palliyil; Lebo; Patel (2013) obtiveram valores de solubilidade maiores que 20 mg/mL do CPO em tampão PBS à 32°C.

Já em temperatura ambiente, a solubilidade do CPO em água foi em torno de 12,4 mg/mL (NOGUEIRAS-NIETO, LUIS; BEGOÑA DELGADO-CHARRO; OTERO-ESPINAR, 2013).

Figura 9 – Estrutura química do Ciclopirox olamina.



Fonte: PubChem (2021).

O mecanismo de ação do ciclopirox é complexo, tendo como alvo diversos processos metabólicos da célula e diferentemente da maior parte dos antifúngicos, o CPO não afeta a biossíntese de esteróis. Possui alta afinidade por cátions trivalentes como o Fe^{3+} , depletando esse cofator essencial em enzimas como os citocromos. Em decorrência dessa depleção por quelatação, o CPO modifica o metabolismo celular, pois afeta os processos de transporte de elétrons mitocondrial na produção de energia. Além disso, o reduz CPO a atividade da catalase e da peroxidase, que são responsáveis pela degradação intracelular de peróxidos tóxicos.

Em adição, os primeiros estudos de Sakurai *et al.*, (1978) sobre o mecanismo, mostraram que a absorção de nutrientes para o reservatório interno é afetada e em células em crescimento, a escassez intracelular de aminoácidos e nucleotídeos essenciais contribui secundariamente para redução da síntese de proteínas ou ácidos nucleicos (IWATA; YAMAGUCHI, 1981; MARKUS, 1999).

Este antifúngico em altas concentrações, pode alterar a permeabilidade da célula fúngica (GUPTA, ADITYA K; SKINNER HBSC, 2003). Um estudo *in vitro* mostrou que CPO modificou a membrana plasmática de dermatófitos e de *Candida albicans*. (GASPARINI *et al.*, 1986). Os efeitos deste fármaco na ultraestrutura celular *in vivo* foram mostrados por microscopia eletrônica, evidenciando uma desorganização de subestruturas internas, que subsequentemente levam danos às membranas celulares (PALACIO-HFRNANZ *et al.*, 1990).

Esta diversidade inerente ao mecanismo de ação do CPO indica que o desenvolvimento de resistência microbiana é menos provável do que com outros antifúngicos. Somando-se a isto, o fármaco demonstra eficácia contra bactérias gram-positivas e gram-negativas, incluindo *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina, ofloxacina e vancomicina. Tem um amplo espectro de ação, inibindo quase todos os dermatófitos, leveduras e fungos clinicamente relevantes, incluindo as espécies *Candida glabrata*, *Candida krusei* e *Candida guilliermondii*. (LOHAUS; DITTMAR, 1981; MARKUS, 1999; NIEWERTH *et al.*, 2003).

O fármaco está disponível na forma de esmalte a 8%, que foi aprovado pelo FDA em 1999 para uso em unhas dos pés. Verificou-se que é eficaz no tratamento de onicomicose leve a moderada. Assim como os outros antifúngicos para uso tópico, as taxas de cura com CPO são menores do que as taxas de cura para os fármacos antifúngicos sistêmicos. Um estudo com meta-análise de 11 trabalhos com CPO, compreendendo um total de 2.174 pacientes, encontrou uma taxa média de cura micológica de 52,4% (GUPTA, ADITYA K.; JOSEPH, 2000). A duração recomendada do tratamento é de até 24 semanas nas unhas das mãos e até 48 semanas nas unhas dos pés (SHEMER *et al.*, 2010).

Os estudos norte-americanos demonstraram principalmente eficácia contra a infecção por *T. rubrum*, já em estudos fora dos Estados Unidos, o esmalte de ciclopirox demonstrou um amplo espectro de atividade com eficácia contra espécies de *Candida* e fungos não dermatófitos, como *Scopulariopsis brevicaulis*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus fumigatus* e *Scytalidium dimidiatum* (FINCH; WARSHAW, 2007; ULBRICHT; WORZ, 1994).

Como esperado para uma terapia tópica, os efeitos adversos graves do ciclopirox 8% em esmalte são raros. Em um grande estudo realizado com 231 pacientes em tratamento com ciclopirox tópico, nenhum interrompeu o tratamento por causa de algum efeito colateral (GUPTA, ADITYA K.; JOSEPH, 2000; SHEMER *et al.*, 2010). O efeito colateral mais observado (em 7% dos pacientes) associado ao uso de CPO foi irritação da área periungueal. Dessa forma o esmalte de ciclopirox para onicomicose pode ser uma opção razoável para pacientes com doença leve e limitada ou que são incapazes de tolerar agentes antifúngicos orais (FINCH; WARSHAW, 2007).

Gupta; Fleckman; Baran (2000), conduziram dois estudos multicêntricos duplo-cegos e controlados para avaliar a eficácia do esmalte de unhas contendo ciclopirox a 8% contra onicomicose causada por dermatófitos. O esmalte foi aplicado diariamente por 48 semanas em todas as unhas afetadas. Os pacientes que receberam placebo aplicaram o esmalte sem o fármaco. Ao final do estudo, a taxa de cura micológica em ambos os estudos foi

significativamente maior com o esmalte para unhas contendo ciclopírox em comparação com o veículo placebo (Estudo I: 29 vs 11% e Estudo II: 36 vs 9%).

Na Europa, uma nova tecnologia baseada em hidroxipropilquitosana (HPCH) está sendo usado para veicular ciclopírox 8% como um esmalte hidrofílico (GHANNOUM, M. A. *et al.*, 2015; MONTI, D. *et al.*, 2013). Essa formulação não está aprovada para o tratamento de onicomicose nos EUA, mas é aprovado e comercializado em mais de 40 países (IORIZZO *et al.*, 2015).

3.4 LIBERAÇÃO E PERMEÇÃO TRANSUNGUEAL

Experimentos *in vitro* ainda desempenham um papel fundamental no desenvolvimento de formas farmacêuticas, principalmente quando a difusão do fármaco através de uma barreira biológica representa um fator crítico (MONTI, D. *et al.*, 2011a; SCHÄFER-KORTING *et al.*, 2008).

Após desenvolvidas, as formulações para administração tópica devem ser adequadamente avaliadas quanto a liberação do fármaco a partir do veículo (utilizando membranas artificiais); a permeação do fármaco (utilizando biomembranas) e sua retenção na biomembrana. Os métodos mais comuns para avaliar a liberação e permeação utilizam células de difusão estáticas, que traz boa reprodutibilidade dos resultados, no entanto, falta informações sobre os efeitos do fluxo sanguíneo na absorção do fármaco, já que condições *in vivo* não podem ser totalmente reproduzidas (FLORES *et al.*, 2018).

Quando se utiliza membranas sintéticas na célula de difusão, é possível analisar a liberação do fármaco da formulação, visto que essa membrana não deve ser uma barreira limitante para a passagem do fármaco como as biomembranas. Assim, a liberação irá depender principalmente da atividade termodinâmica e da solubilidade do fármaco na formulação, dentre outros fatores (LUIS MENEZES CARVALHO, 2007).

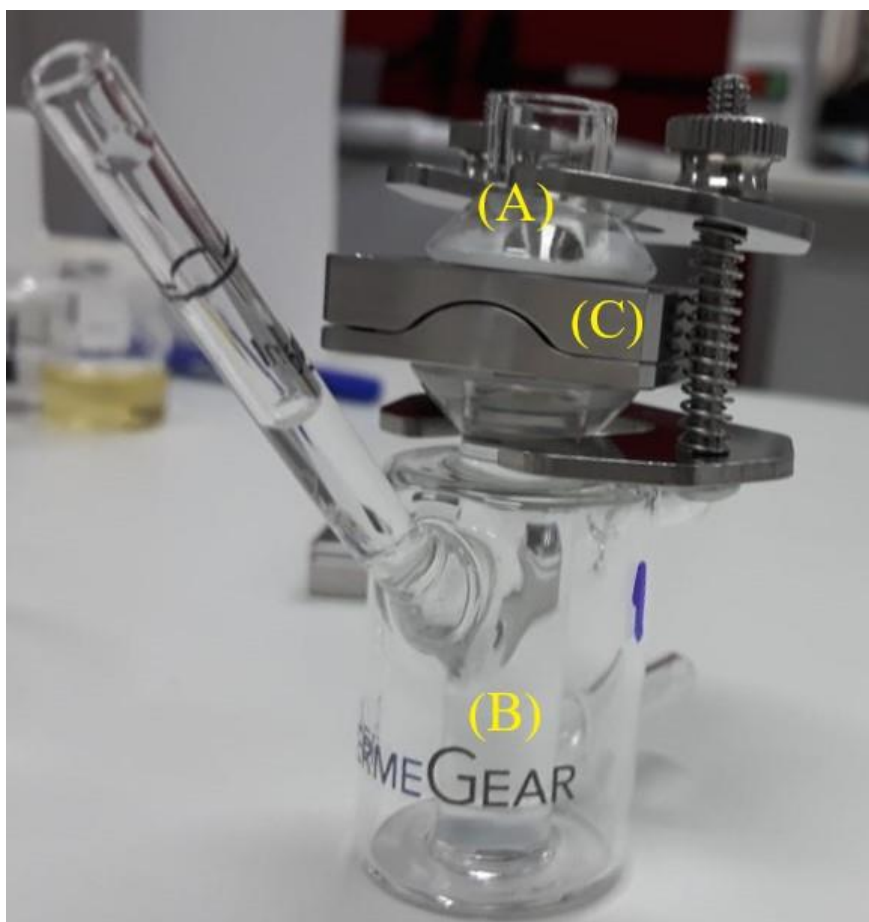
A permeação transungueal tem sido sistematicamente estudada nas últimas três décadas usando diferentes biomembranas como modelo *in vitro* de avaliação, entre eles o casco bovino, recortes de unhas de voluntários humanos saudáveis além das lâminas ungueais de cadáveres humanos (EL-SHERIF; SHAMMA; ABDEL BARY, 2018; GÓMEZ *et al.*, 2018; SUGIURA *et al.*, 2014).

Cascos bovinos têm sido usados frequentemente como uma alternativa à unha humana em estudos de permeação. Porém, os cascos são mais permeáveis do que a lâmina ungueal

humana, já que sua matriz é constituída de queratina menos densa e as proteínas do casco têm significativamente menos resíduos de cistina e, conseqüentemente, menos ligações dissulfeto do que nas unhas humanas (BADEN; KUBILUS, 1983; ELKEEB *et al.*, 2010; MERTIN; LIPPOLD, 1997). Por isto, de acordo com Nogueiras-Nieto *et al.* (2011), é necessário ter cautela na extrapolação dos dados obtidos com estudos que utilizaram cascos para unhas humanas. Monti *et al.* (2011a), por sua vez, confirma a validade do uso de casco bovino como modelo para unhas humanas de pés infectados; sugere uma equivalência substancial entre os dois modelos.

Para condução dos estudos de permeação transungueal e retenção ungueal, a célula de difusão vertical é usada, acoplada a um adaptador de unha (Figura 10). A biomembrana escolhida é montada no adaptador de unha e este é colocado entre os compartimentos doador e receptor da célula. A formulação/medicamento é aplicada no compartimento doador enquanto o compartimento receptor, com diferentes volumes, a depender do tipo de célula utilizado, é preenchido com um líquido receptor adequado, que deve manter as condições sink, durante todo o experimento. O líquido no compartimento receptor é mantido a uma temperatura de 32°C e agitado com auxílio de uma barra de agitação magnética. A permeação através da biomembrana pode ser determinada analisando as amostras retiradas em intervalos regulares de tempo do compartimento receptor. Além disso, a quantidade de fármaco retida na biomembrana também pode ser determinada ao final do estudo (SHIVAKUMAR *et al.*, 2012).

Figura 10 - Célula de difusão vertical de Franz com adaptador de unha.



(A) Compartimento doador. (B) Compartimento Receptor. (C) Adaptador de unha.

Fonte: Acervo pessoal.

De forma geral, a difusão dos fármacos através da lâmina ungueal é determinada pelos seguintes fatores: peso molecular do fármaco; polaridade do fármaco; natureza e pH do veículo e carga superficial.

À medida que o peso molecular aumenta, o coeficiente de permeabilidade dos fármacos através da lâmina ungueal humana e cascos bovinos diminui (MERTIN; LIPPOLD, 1997). Conforme o tamanho molecular aumenta, a taxa de permeação diminuiu devido ao aumento do contato entre o fármaco e a rede de queratina. Uma relação linear inversa foi mostrada entre o coeficiente de permeabilidade de vários compostos (iônicos e não iônicos) através da unha humana e o peso molecular desses compostos (KOBAYASHI *et al.*, 2004).

A difusividade das moléculas através da lâmina ungueal também é influenciada pelo coeficiente de partição do fármaco. Na maior parte dos casos, a permeação diminuiu com o aumento da lipofilia do permeante, devido à natureza hidrofílica da lâmina ungueal. Walters;

Flynn; Marvel (1985) demonstraram esta relação entre o coeficiente de permeabilidade e a lipofilicidade para uma série de álcoois homólogos variando no comprimento da cadeia de carbono.

Em relação aos veículos utilizados, a água desempenha um papel facilitador na permeação de moléculas solúveis em água através da lâmina ungueal, já que as unhas incham ao entrar em contato com soluções aquosa, pois a água é absorvida pela lâmina ungueal e como resultado disso, a rede de queratina se expande e afrouxa, levando à formação de poros maiores, aumentando a permeação das moléculas (SHIVAKUMAR *et al.*, 2012; WALTERS; FLYNN; MARVEL, 1985).

Geralmente, as moléculas precisam estar no estado solúvel e não ionizado para permear através da unha. Logo, o pH do veículo aquoso determina a extensão da ionização, a solubilidade aquosa do fármaco e sua interação com a lâmina ungueal. A ionização é determinada pelo valor de pKa do fármaco e o pH do veículo. Como regra geral, os fármacos ácidos estão não ionizados em valores de pH mais baixos, enquanto os fármacos básicos permanecem não ionizados em valores de pH mais altos. Por isso, se espera que fármacos ácidos tenham maior permeação em veículos com baixos valores de pH, enquanto os fármacos básicos mostram melhor permeação na presença de veículos com altos valores de pH (MURTHY; WISKIRCHEN; BOWERS, 2007).

Outro fator que tem influência na difusão de moléculas através das unhas é a carga de superfície do fármaco. A queratina da unha possui um ponto isoelétrico (pI) de aproximadamente 5, portanto, carrega uma carga superficial líquida positiva em pH abaixo de 5, enquanto uma carga líquida negativa em pH acima de 5,0. Ou seja, um fármaco carregado negativamente será repelido da superfície da unha em valores de pH mais altos, enquanto um fármaco carregado positivamente terá repulsão em valores de pH mais baixos. A interação eletrostática entre a superfície da unha e as moléculas difusoras com carga superficial é denominada “efeito Donnan” (MURTHY; WISKIRCHEN; BOWERS, 2007; SHIVAKUMAR *et al.*, 2012).

3.4.1 Promotores de permeação

Para melhora da terapia tópica, diferentes técnicas de promotores físicos e químicos são usados com objetivo de aumentar a penetração transungueal e manter as concentrações terapêuticas do fármaco no leito ungueal (BROWN *et al.*, 2009; HAO; SMITH; LI, 2008;

QUINTANAR-GUERRERO *et al.*, 1998)(MURDAN, 2008; NOGUEIRAS-NIETO, L. *et al.*, 2011).

Como estratégia de promotores de permeação químicos, alguns compostos de tiol, como N-acetil-l-cisteína, 2-mercaptoetanol, N-2-mercaptopropionil glicina e ácido tioglicólico, quebram as ligações dissulfeto presentes na lâmina ungueal. Se espera que com essa ruptura estrutural, haja a formação de novos poros interconectados por canais de transporte e o aumento da rede de canais facilite a penetração do medicamento. Ou seja, pretende-se que esses promotores de penetração induzam mudanças perceptíveis na microestrutura da lâmina ungueal. No entanto, isso não foi completamente demonstrado até o momento. A hidratação da lâmina ungueal aumenta a permeação ungueal de alguns fármacos supostamente por amolecer e aumentar a flexibilidade da lâmina ungueal que, uma vez inchada, permitiria que os fármacos se difundissem mais facilmente, por aumentar os poros na lâmina ungueal. No entanto, as alterações induzidas pela hidratação na microestrutura da unha não foram demonstradas (GUNT; KASTING, 2007; KOBAYASHI *et al.*, 1998; MURDAN, 2002, 2008).

Além dessas substâncias, a ureia e o ácido salicílico causam hidratação e inchaço das unhas, levando a danos e fratura da lâmina ungueal (KOBAYASHI *et al.*, 1998; SHANBHAG; JANI, 2017).

No entanto a ureia não mostra melhora no fluxo transungual quando usada sozinha em muitos casos. Tal ineficiência foi atribuída ao aumento do pH que ocorreu após a adição de ureia, que pode ter causado ionização de alguns fármacos. Outras substâncias também foram relatadas como promotoras de permeação transungueal como a N-metil-2-pirrolidona, polipropilenoglicol 400, dimetilsulfóxido, labrasol, mercaptoetanol e transcutoil, que demonstraram aumentar a permeação através da membrana de cascos bovinos (SHIVAKUMAR *et al.*, 2012).

Outro promotor de permeação, a papaína, uma endopeptidase, contém um grupo sulfidril altamente reativo que cliva a ligação dissulfeto na proteína da unha e desestabiliza a rede de queratina, ampliando as vias de difusão para a passagem do fármaco, sendo mais eficaz que a ureia e o ácido salicílico no aumento da penetração transungueal (SHANBHAG; JANI, 2017).

Técnicas físicas também são usadas para melhorar a permeação transungueal: Abrasão da superfície da placa ungueal; Lasers pulsados; Microporação; Ultrassom de baixa frequência e Iontoforese.

A lâmina ungueal é composta por três camadas, as camadas dorsal, intermediária e a ventral, a camada dorsal da unha é considerada a principal barreira para a penetração de

fármacos na unha. Um dos métodos físicos empregados para melhorar a permeação transungueal na rotina de usos dos medicamentos tópicos como os esmaltes, é o lixamento da superfície dorsal da placa ungueal usando um abrasivo. A remoção da camada dorsal se mostra útil para superar a barreira e facilitar a penetração (REPKA *et al.*, 2002; SHIVAKUMAR *et al.*, 2012).

Outra estratégia física para superar as barreiras que limitam a penetração de fármacos, é o uso de laser pulsado. Na aplicação, a energia do laser é absorvida pela queratina na lâmina ungueal e o calor espalhado leva à remoção das camadas da unha, resultando em crateras. A forma, o tamanho e a lisura das paredes das crateras formadas dependem do tipo de laser empregado. Descobriu-se que o laser pulsado ultracurto exhibe as melhores eficiências de abrasão sem rachaduras ou danos térmicos à lâmina ungueal. No entanto, a eficácia do laser *in vivo* na permeação transungueal ainda não foi estabelecida e os estudos a laser não forneceram taxas de eficácia para desfechos médicos que igualem ou excedem aqueles encontrados com terapias tradicionais (tratamentos orais e tópicos) (BRISTOW; BARAN; SCORE, 2016; BRISTOW, 2014; GUPTA; VERSTEEG, 2017). Diante disto, é necessária uma avaliação adicional da sua eficácia a partir de parâmetros médicos comparáveis (GUPTA, ADITYA K. *et al.*, 2018).

Aprovado pelo FDA, PathFormer® (Path Scientific, Carlisle, EUA) (Figura 11) é um dispositivo de microcorte desenvolvido para criar orifícios de profundidade específica na lâmina ungueal sem afetar o leito ungueal a fim de drenar hematomas subungueais. Apresenta vantagens, como a utilização da resistência elétrica do leito ungueal como um sinal para parar e retrain a broca quando ela penetra na lâmina ungueal e a não necessidade de anestesiá-lo o paciente (CIOCON *et al.*, 2006). Com a finalidade de ser um promotor físico de permeação, este dispositivo foi empregado em um ensaio clínico para fazer orifícios antes da aplicação do creme de terbinafina e do creme placebo. Embora a permeação transungueal de terbinafina tenha sido promovida, o número de orifícios perfurados e a extensão promoção obtido não são revelados (ANDREAS BOKER, 2007).

Figura 11 - PathFormer®.



Fonte: <https://www.pathscientific.com/products>.

Outras estratégias para promoção física são relatadas na literatura científica. Bristow *et al.*, (2016) usaram um novo sistema de broca de unha, a Clearanail® (*Medical Device Treatment Ltd., Brighton, UK*) (Figura 12) que permite a micropenetração controlada da unha sem penetrar no leito ungueal (Figura 13). Já Chiu *et al.* (2015) usaram um dermaroller (*In finite Beauty, Birmingham, UK*) (Figura 14) que possui agulhas de titânio de 250 µm de comprimento para produzir microporos na superfície da unha com objetivo de melhorar a permeação de nanopartículas.

Figura 12- Clearanail®.



Fonte: (BRISTOW, IVAN; BARAN; SCORE, 2016).

Figura 13- Unha micótica antes e depois da perfuração.



Fonte: (BRISTOW, IVAN; BARAN; SCORE, 2016).

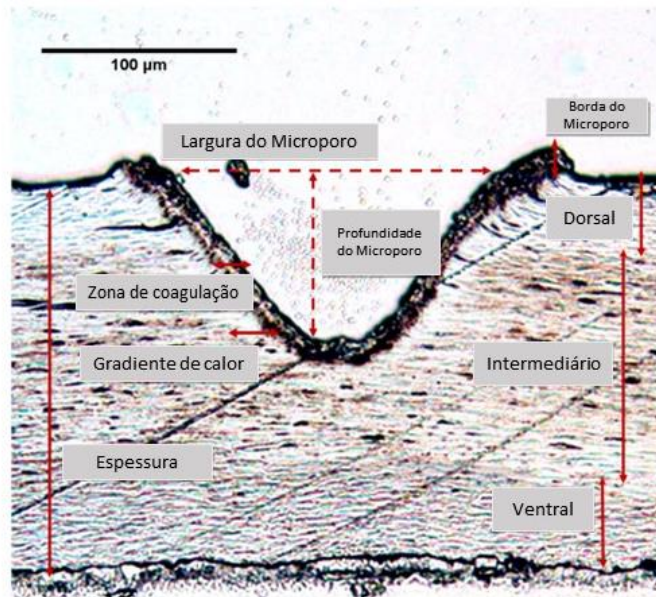
Figura 14 - Dermaroller (*In finitive Beauty, Birmingham, UK*).



Fonte: <https://infinitive-beauty.dermaroller.biz/> Acesso em: 12 de fevereiro de 2021.

Estudo de imagem realizado por Ortner *et al.* (2021) trás uma investigação de confiabilidade e limitações de técnicas de imagem óptica morfométrica de unha micoporada com laser pulsado, como uma forma auxiliar na avaliação do procedimento de microporação e bem como na avaliação de segurança (Figura 15).

Figura 15- Imagem de microscopia de campo amplo de tecido ungueal saudável crio-seccionado, exibindo a morfologia da placa ungueal e as medições da morfologia dos microporos (vermelho).



Fonte: Adaptado de Ortner et al. (2021).

Ultrassom de baixa frequência também é uma técnica de promoção física que foi avaliada através de membranas de cascos bovinos. Uma frequência de 20 kHz e uma intensidade de 50% foi aplicada às membranas usando uma sonda mantida a uma distância de 13 mm da superfície da unha, como procedimento de pré-tratamento por 1 minuto de forma pulsátil. A maior permeação do fármaco foi atribuída à ruptura induzida por ultrassom da membrana do casco. Embora o mecanismo de ruptura da membrana ainda não tenha sido elucidado, foi proposto que a cavitação inercial ou a formação de fossas fazem parte do mecanismo envolvido (TORKAR; KRISTL; MURDAN, [S.d.]).

No entanto, a técnica física mais abordada na literatura é a iontoforese, definida como um método que facilita a permeação de um composto através de uma membrana com o auxílio de um campo elétrico. A aplicação de correntes elétricas causa grandes aumentos no fluxo ungueal de fármacos em comparação com o transporte passivo. O Método de Iontoforeses aumentou o fluxo de várias moléculas, incluindo fluoresceína, glicose, ácido salicílico, tetraetilamônio, manitol, ureia, griseofulvina e terbinafina para e/ou através da placa ungueal. O pH do veículo, a força iônica do tampão e a densidade da corrente são os principais fatores que influenciam a permeação transungueal através da placa ungueal mediado por iontoforese (C RAMASWAMY

et al., 2007; DELGADO-CHARRO, 2012; HAO; LI, 2008; HAO; SMITH; LI, 2008; MURTHY; WISKIRCHEN; BOWERS, 2007).

3.5 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIFÚNGICA DE FORMULAÇÕES TÓPICAS

Estudos *in vitro* são feitos na tentativa de determinar a eficácia de formulações contra a infecção ungueal (MONTI *et al.*, 2019a). Não existe um único teste que consiga atingir este objetivo, mas sim, um conjunto de testes. Nesses ensaios, é necessário comparar os produtos comerciais com a formulação teste para averiguar a atividade e a resistência aos antifúngicos (JO SIU *et al.*, 2013).

Dois testes são considerados padrões, o ensaio de microdiluição e o de determinação da concentração mínima inibitória (CIM). A microdiluição está de acordo com as diretrizes do M38-A2 e M27-A3 do *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI) (JO SIU *et al.*, 2013; “M38-A2 Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Filamentous Fungi; Approved Standard-Second Edition”, 2008). Neles são realizados testes em microplacas de 96 poços de fundo redondo para avaliar a suscetibilidade antifúngica *in vitro*.

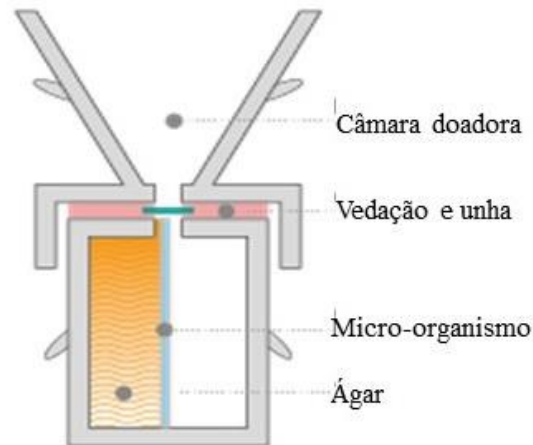
O outro experimento padrão é o de determinação da CIM onde se descobre a menor concentração do antimicrobiano capaz de inibir o desenvolvimento visível do microrganismo. Os valores finais são determinados por comparação visual de poços e controles (ZALACAIN *et al.*, 2011). A comparação é determinante para permitir avaliações das atividades antimicrobiana dos fármacos.

Na literatura científica são encontrados outros testes *in vitro*, que utilizam modelos de unha infectada. Eles são uma nova estratégia para uma avaliação mais precisa da eficácia de novos agentes e formulações contra onicomicose (MERCER *et al.*, 2019). Nesses modelos são encontrados estudos de permeação e penetração através dos cascos bovinos, como unha modelo, a fim de avaliar a atividade antimicótica de permeados da formulação contra isolados de fungos selecionados. Tal teste é conhecido como modelo de placa ungueal infectada e pode ser adaptado utilizando unhas artificiais, filmes feitos de queratina de cabelo humano, recortes de unhas humanas e unhas de cadáveres humanos (GHANNOUM *et al.*, 2019; SUGIURA *et al.*, 2014; TÄUBER; MÜLLER-GOYMANN, 2016).

Células de difusão estática modificada (TurChub®) foram desenvolvidas especificamente para confirmar a penetração do fármaco através da unha e avaliar melhor a atividade antifúngica do fármaco permeado, por meio da inibição do crescimento do fungo (SUGIURA *et al.*, 2014; TRAYNOR *et al.*, 2010). A figura 16 ilustra a célula de difusão

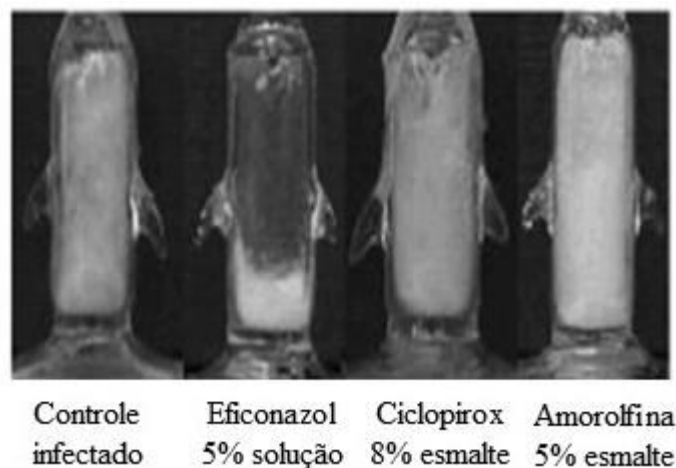
TurChub® criada pela MedPharm na qual seções de unhas humanas servem como barreira através da qual o fármaco penetra inicialmente antes de atingir o compartimento receptor completo com ágar (CHRISTENSEN *et al.*, 2017). Já a Figura 17, mostra a célula TurChub® em formato real.

Figura 16 – Ilustração da célula de difusão estática modificada (TurChub®).



Fonte: Adaptado de <https://www.medpharm.com/us/development-services/performance-testing/>.

Figura 17 - Células TurChub® em estudo com diferentes fármacos, utilizando lâmina ungueal humana.

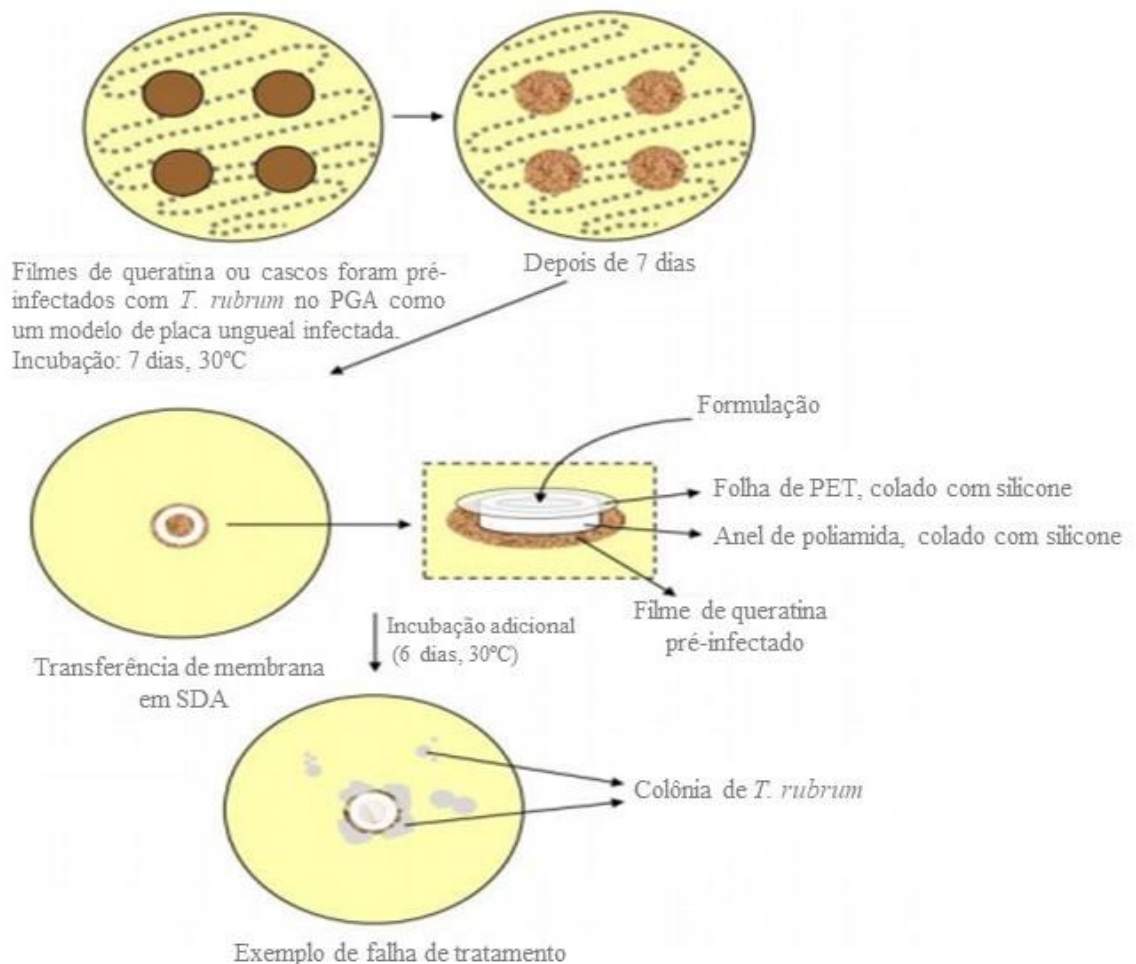


Fonte: Adaptado de (SUGIURA *et al.*, 2014)

Lusiana; Reichl; Müller-Goymann (2013) desenvolveram um modelo *in vitro* de uma lâmina ungueal infectada consistindo em um anel de poliamida a qual foi inserida na membrana infectada e uma folha de PET foi colada por cima a fim de evitar a evaporação de possíveis

compostos voláteis. No anel de poliamida, a formulação é aplicada e a inibição do fungo é avaliada após certo tempo de incubação, como mostra a Figura 18.

Figura 18 - Ensaio *in vitro* de desempenho microbiológico.

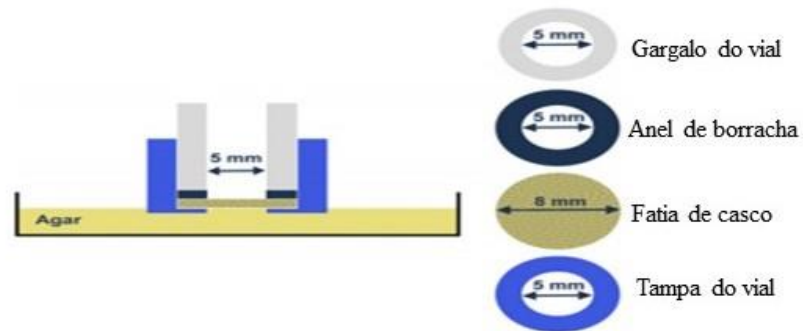


Fonte: Adaptado de (LUSIANA; REICHL; MÜLLER-GOYMAN, 2013).

Outro novo modelo encontrado na literatura científica foi o desenvolvido por Slevén *et al.* (2015). Nele, combinou-se a atividade do medicamento e a sua penetração na unha. Foi necessário adaptar um frasco de rosca o qual foi cortado abaixo do pescoço para criar um reservatório de aplicação da formulação sobre a lâmina ungueal.

Em seguida, as fatias de casco montadas foram colocadas em Ágar Dextrose Sabouraud (ADS), servindo como substituto para o leito ungueal como ilustra a figura abaixo.

Figura 19 - Ilustração do modelo *in vitro* em ADS.



Fonte: Adaptado de (SLEVEN *et al.*, 2015).

Dessa forma, para avaliar a eficácia farmacêutica de novas formulações, os modelos *in vitro* são de grande importância e tentam se aproximar ao máximo da realidade. Uma vez que os modelos *in vivo* atuais, utilizando porquinhos-da-índia e coelhos são demorados, trabalhosos e onerosos (SHIMAMURA *et al.*, 2011; TATSUMI *et al.*, 2002).

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 MATERIAIS

Foi utilizado Ciclopirox Olamina – lote: 19D11-B023-0486, FAGRON; Micolamina® esmalte (TheraSkin®) esmalte foram compradas em uma farmácia local de Recife – lote: T266 e 0212412, respectivamente; Transcutol P, Miristato de Isopropila; Polietilenoglicol 400; Tween® 20 (*Polyoxyethylene sorbitan monolaurate*); Span® 80 (*Sorbitane monooleate*); Tween® 80 (*Polyoxyethylene sorbitan monooleate*); Acetato de etila; Álcool cetosteárilico; Lanette N (*Sodium cetearyl sulfate*); Polawax NF (*Polysorbate 60*); Álcool Etilico; Kolliphor® EL; Poloxamer 407; Propilenoglicol; Álcool isopropílico; Hidróxido de Potássio; Ureia; Hidroxipropilmetilcelulose; Cloreto de sódio; Cloreto de potássio; Fosfato de sódio; Fosfato de potássio; Azida sódica; Ácido oléico; Metanol e Acetonitrila grau HPLC (LiChrosolv®); BRIJ®20 (*Polyoxyethylene 20 oleyl ether*), Croda, East Yorkshire, UK. As vidrarias foram previamente calibradas.

4.2 EQUIPAMENTOS

Os seguintes equipamentos foram utilizados: Banho Dubnoff (modelo Q226M, Quimis); Agitador microplacas (modelo MA562, Marconi); Pipetas automáticas, (Modelo Research plus, Eppendorf); Banho Ultrassom (modelo SSBu, SP Labor); pHmetro (modelo PG 2000, GEHAKA); Cromatógrafo líquido com detector de arranjo de diodos (Nexera X2, Shimadzu). Cabine de segurança biológica (modelo VLFS, Veco) e Estufa microbiológica (SSB, SolidSteel).

4.3 REVISÃO SISTEMÁTICA

Com o propósito de embasar a execução deste projeto, foi realizada uma revisão sistemática da literatura, a partir da pergunta norteadora “Com base em estudos de permeação ungueal, as formulações desenvolvidas são mais eficazes do que os produtos comercializados para unhas contendo ciclopirox?”. A questão de pesquisa foi construída por meio da aplicação da estratégia PICO, um acrônimo para *Population of interest* (população ou problema), *Intervention* (intervenção), *Comparator* (comparador) e *Outcome* (desfecho). A

população/problema foi definida como “baixa permeação e retenção do ciclopirox em tratamentos tópicos para onicomicoses”, a intervenção como “aplicação de formulação tópica contendo ciclopirox em estudos de permeação/retenção ungueal”, a comparação considerada como “comparação entre formulações tópicas do mercado e formulações desenvolvidas com o mesmo fármaco” e optou-se a não restrição dos desfechos.

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

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

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

4.4 ESTUDO DE SOLUBILIDADE DO CICLOPIROX OLAMINA

Com o objetivo de planejar racionalmente o desenvolvimento de formulações contendo Ciclopirox Olamina (CPO), a solubilidade do fármaco foi investigada em diferentes tensoativos, óleos, solventes e misturas de solventes.

Foram preparadas dispersões de CPO, adicionando excesso do fármaco (600 mg) em microtubo com tampa contendo 1mL de diferentes meios (Cremophor EL, Tween 20, Ácido oleico, Álcool isopropílico, Tween 80, Propilenoglicol, Miristrato de isopropila, Transcutol P, água e misturas de solventes, conforme tabela abaixo).

Tabela 4 – Composição das misturas de solventes (em percentual).

Solventes	Mistura (%)								
	A	B	C	D	E	F	H	I	J
Água ultrapura	50	30	10	33,33	25	15	33,33	25	15
Álcool isopropílico	50	70	90	33,33	50	70	33,33	50	70
Propilenoglicol	-	-	-	33,33	25	15	-	-	-
Transcutol P	-	-	-	-	-	-	33,33	25	15

Fonte: a autora.

Essas dispersões foram homogeneizadas por meio de agitação em banho (Dubnoff Microprocessado, Quimis®) à temperatura controlada ($32 \pm 2^\circ\text{C}$), por um período de 72 horas e, em seguida, centrifugadas ($2500 \text{ g} \approx 3000 \text{ rpm}$) por 30 minutos, uma alíquota do sobrenadante foi retirada, filtrada em filtro de seringa ($0,45 \mu\text{m}$) e diluída. A concentração do fármaco foi determinada por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplada ao detector de arranjo de diodos (CLAE-DAD).

4.5 DESENVOLVIMENTO DAS FORMULAÇÕES UNGUEAIS DE CICLOPIROX OLAMINA

Com base nos resultados do teste de solubilidade, uma série de formulações de gel (GH) e termogel (GP) foi preparada. Posteriormente, com base nos resultados dos estudos de liberação do fármaco a partir desses veículos, algumas modificações adicionais para GH6 foram testadas. A composição de todas as formulações desenvolvidas se encontra no item 5.3 dos resultados.

Para preparação dos géis de HPMC, o polímero foi adicionado na água e agitado em vórtex até a total solubilização. Em seguida, os demais constituintes foram adicionados à formulação na seguinte sequência: a ureia (hidratante) e o hidróxido de potássio (agente alcalinizante) previamente triturados, o lauril sulfato de sódio, o álcool isopropílico e por fim o fármaco.

Na preparação do termogel, foi usado Poloxamer® como agente gelificante, que foi inicialmente adicionado à água e ao propilenoglicol e em seguida inserido o álcool isopropílico. A preparação foi mantida durante 24h em geladeira (2-8°C) para completa solubilização do polímero. Após este tempo, o CPO foi incorporado à formulação.

O esmalte Micolamina® (formulação referência) foi adquirido em farmácia local a fim de, juntamente com as formulações desenvolvidas, seguir com os ensaios de performance (ensaio de liberação *in vitro* e permeação *ex vivo* utilizando células verticais de difusão de Franz).

50µL das formulações selecionadas para o ensaio microbiológico, foram colocadas em lâminas de vidro, a uma temperatura de $32 \pm 1^\circ\text{C}$ visando avaliar o aparecimento de cristais em microscópio óptico após 10, 20, 30, 60, 90, 120 e 240 minutos.

4.6 CARACTERIZAÇÃO DAS FORMULAÇÕES

Após o desenvolvimento, as formulações foram caracterizadas quanto suas características organolépticas, determinação de pH e doseamento do fármaco. Todas as análises foram realizadas, no mínimo, em triplicata e os resultados apresentados por média $\pm$ desvio padrão (DP).

4.6.1 Determinação do pH

O pH das formulações desenvolvidas foi determinado através de pHmetro modelo PG 2000 (GEHAKA), previamente calibrado com as soluções tampão de pH 7,0 e pH 4,0 a $25,0 \pm 0,5^\circ\text{C}$ (BRASIL, 2008), enquanto o pH da formulação comercial (Micolamina® esmalte) foi avaliado por papel indicador de pH (MQuant®-Merck), devido ao pequeno volume disponível.

4.6.2 Doseamento de CPO nas formulações desenvolvidas e na formulação comercial Micolamina® esmalte

Para quantificar o teor de CPO contido nas preparações, foi adicionado 6,25µL de cada formulação (n=3) para 10mL de líquido extrator (etanol:água 70:30). Essa mistura foi ao vórtex por 1 minuto e em seguida foi mantida por 10 minutos sob agitação em mesa agitadora. As amostras foram filtradas e quantificadas por CLAE-DAD. O mesmo procedimento foi realizado para o produto comercial Micolamina® esmalte.

4.7 VALIDAÇÃO DO MÉTODO ANALÍTICO POR CROMATOGRAFIA LIQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA COM DETECÇÃO DE ARRANJO DE DIODOS (CLAE-DAD)

As análises foram realizadas em Cromatógrafo líquido Nexera X2, Shimadzu® equipado com detector de arranjo de Diodos (DAD). Foi utilizada como fase móvel acetonitrila:solução aquosa de EDTA 1mM, contendo 20mM de ácido fosfórico, no modo gradiente, iniciando com: 10% da fase orgânica (bomba B) e 90% da fase aquosa (bomba A) como condição inicial, permanecendo por 2,5 minutos nessa proporção; 2,5- 9 minutos, 60% bomba B e 40% bomba A; 9-10 minutos, a condição inicial de 10% bomba B e 90% bomba A foi retornada para o reequilíbrio da coluna.

Foi utilizada uma coluna cromatográfica Gemini-NX C18 (150 x 4.6mm 5µ) do tipo C-18 de fase reversa, como fase estacionária, fluxo de 1 mL/min, volume de injeção de 40 µL, a detecção do fármaco foi realizada no comprimento de onda de 303 nm, com tempo total de análise de 10 minutos e tempo de retenção para o Ciclopirox Olamina (CPO) de 6,2 minutos. Os dados foram obtidos utilizando o software LC Solution® versão 1.25.

O método por CLAE-DAD para doseamento de CPO foi validada parcialmente seguindo orientações da RDC nº 166/17 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) para os métodos analíticos, seguindo os parâmetros de seletividade, linearidade, exatidão e precisão.

A seletividade do método foi verificada a partir da avaliação de fase móvel; tampão fosfato salino (PBS) pH 7,4; PBS com azida sódica (30mg/L); branco de unha humana; solução extratora de unha (etanol:água 70:30), frente a uma solução padrão de CPO (5 µg/mL). No caso do branco de unhas humanas, 3 amostras de unhas de diferentes doadores foram picotadas com auxílio de tesoura e colocadas em microtubos de 1,5ml, 1 mL de uma mistura etanol:água (70:30) foi adicionado e estes ficaram agitando em mesa agitadora por 7 dias, seguindo de

filtração em filtros de seringa (0,45 µm) e quantificados por CLAE-DAD. O critério utilizado para avaliar a seletividade do método foi a ausência de pico no tempo de retenção do fármaco.

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

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

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

A linearidade do método foi verificada nas concentrações de 5; 10; 20; 30; 50 e 100 µg/mL de CPO em tampão fosfato salino (PBS) pH 7,4, obtidas a partir de uma solução inicial de 1000 µg/mL de CPO em metanol. Para avaliar o resultado da linearidade, foi utilizado o método dos Mínimos Quadrados Ordinários com aplicação do teste F da ANOVA para avaliação do coeficiente angular com nível de significância de 5%. A análise da dispersão foi realizada aplicando o teste Shapiro-Wilk para avaliação da distribuição dos resíduos. Já a homoscedasticidade foi realizada pelo teste de Breusch Pagan para avaliar a normalidade da distribuição dos resíduos.

A precisão foi realizada em dois níveis: repetibilidade: onde as amostras foram avaliadas sob as mesmas condições de operação, mesmo analista e mesma instrumentação, em uma única sequência analítica para determinação de 5 concentrações: Limite de quantificação (LIQ), Controle de qualidade baixo (CQB); médio (CQM), alto (CQA) e de diluição (CQD), com 5 réplicas em cada nível. E pela precisão intermediária: onde as amostras foram avaliadas no mesmo laboratório, em dois dias diferentes, e por operadores distintos. As análises contemplaram as mesmas concentrações e o mesmo número de determinações descritas na avaliação da repetibilidade.

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

A exatidão foi realizada de forma similar à precisão, no entanto foi aplicado o teste t-student para avaliarmos uma recuperação de 100%. Foi estabelecido um limite inferior de 95% e um limite superior de 105%, os dados foram analisados com um nível de significância de 5%. Todas as análises estatísticas foram realizadas através do programa *Action Stat* Versão 3.7

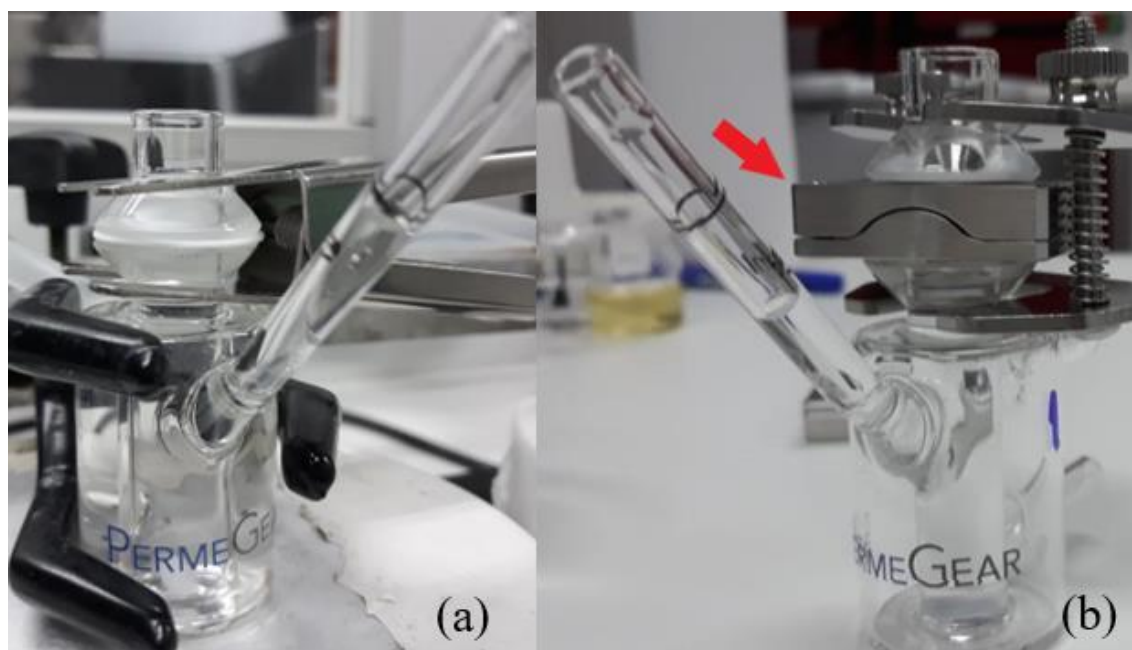
4.8 ESTUDOS DE CINÉTICA DE LIBERAÇÃO *IN VITRO*, PERMEAÇÃO *EX VIVO* E RETENÇÃO UNGUEAL DO CICLOPIROX OLAMINA

A cinética de liberação e permeação ungueal foram realizados utilizando sistema manual de células verticais de difusão de Franz sem adaptadores e com adaptadores de unha PermeGear para as células de Franz (PermeGear, Inc., EUA), respectivamente (Figura 20). Baseado na literatura, foi utilizado tampão fosfato-salino (PBS) pH 7,4 como líquido receptor (CHOUHAN; SAINI, 2016b; CUTRÍN-GÓMEZ *et al.*, 2018a; DÍAZ *et al.*, 2019; TÄUBER; MÜLLER-GOYMANN, 2015).

No primeiro estudo foram utilizadas três membranas artificiais (hidrofílica, silicone, hidrofóbica). Já os estudos de permeação ungueal foram realizados com recortes de unha humana, obtidos de voluntários saudáveis após consentimento informado.

A aprovação ética foi concedida pelo Comitê de Ética em Seres Humanos da Universidade Federal de Pernambuco sob número de CAAE: 27554719.1.0005208 (Anexo I).

Figura 20 - Célula vertical de difusão de Franz.



sem adaptador (a); com adaptador de unha (seta vermelha) (b).

Fonte: a autora.

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

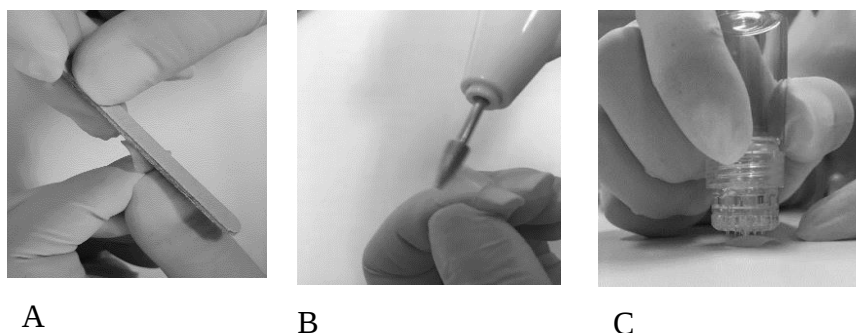
A etapa de obtenção de unhas humanas iniciou com a divulgação da pesquisa e a busca por participantes para doação de suas unhas de forma voluntária, os indivíduos interessados entraram em contato com o grupo de pesquisa, que explicou com detalhes o objetivo do estudo e forneceu a eles um formulário contendo todas as informações e o Termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE).

As unhas dos participantes (exclusivamente das mãos) deveriam ser deixadas para crescer até que a borda livre medisse no mínimo 8 mm, comprimento mínimo necessário para montar a unha no adaptador de unhas para as células de Franz (PermeGear, Inc., EUA), onde será realizado o ensaio de permeação ungueal. Para codificação de cada unha, foram utilizadas as letras iniciais dos dados dos doadores entre eles: nome, mão (esquerda ou direita) e o número relacionada a cada dedo (1, 2, 3, 4 e 5) contados do dedo mínimo ao polegar.

Após as doações, os recortes de unhas humanas saudáveis foram mantidos congelados a -20°C até o uso. Antes de serem utilizados para testes de permeação e teste antifúngico, as unhas cortadas foram descongeladas e submetidas a dois tratamentos físicos.

O primeiro tratamento das unhas envolveu hidratação em tampão salino (PBS) pH 7,4 por 24 horas, seguida de lixamento da superfície dorsal das unhas para trás e para frente em um total de 5 vezes utilizando uma lixa de unha (Figura 21A); estas unhas são referidas como unhas não poradas (NP). O segundo tratamento da unha envolveu lixamento da superfície dorsal das unhas para trás e para frente em um total de 5 vezes utilizando uma lixa elétrica (Figura 21B), seguida de microporação das unhas cinco vezes usando um dispositivo comercialmente disponível (Hydra.needle™) com agulhas de titânio de 0,60 mm de comprimento (Figura 21C). O processo resultou na presença de aproximadamente 20 poros na área de difusão usada para os testes de permeação e microbiológico. Estas unhas são referidas como unhas microporadas (MP).

Figura 21 – Procedimentos de lixamento (A e B) e microporação da unha no lado dorsal com agulhas de titânio (Hydra.needle™) (C).



A

B

C

Fonte: a autora.

Para avaliar a profundidade dos poros formados com o Hydra.needle™, três unhas submetidas à microporação foram cortadas ao meio e colocadas verticalmente em um suporte de criostato com o lado cortado para cima. O emblocamento (Figura 22) foi realizado em gel (Tissue-Tek® O.C.T.™ Compound by Sakura) após isso, as amostras foram congeladas e cortadas em um criostato (Leica CM1860UV, Leica Microsystems, Wetzlar, Alemanha) a -27°C. Para cada unha, as amostras a serem fotografadas foram obtidas a partir de 5 seções de unha, com cortes transversais seriados dois a dois com espessura de 7 µm e posteriormente montadas em lâminas de microscopia. No mesmo dia, as amostras foram observadas em microscópio de fluorescência (Leica DMI4000 B, Alemanha) com objetiva de 20x. As unhas foram fotomicrografadas e a espessura total da unha bem como a profundidade dos poros foram medidas com auxílio do software ImageJ (National Institutes of Health).

Figura 22 – Processo de emblocamento da unha para corte em criostato. Aplicação do gel para emblocamento (A) e unha emblocada em gel (após congelamento) (B).



(A)



(B)

Fonte: a autora.

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

Na montagem do sistema manual para os estudos de cinética de liberação *in vitro* das formulações contendo CPO, foram utilizadas três membranas diferentes: uma membrana mista de ésteres de celulose (GSWP), da Merck Millipore Ltd. Millipore®, poro de 0,22 μm , lote R5PA92282 (hidrofílica), essa membrana foi previamente hidratada com o líquido receptor (PBS pH 7,4) por um período de 12 horas; membrana de elastômero de silicone sintético (Dow Corning® 7-4107), 75 μm de espessura, sem hidratação prévia e membrana de politetrafluoretileno (PTFE) da Filtrilo, poro de 0,45 μm , lote 2NDO12021AL (hidrofóbico).

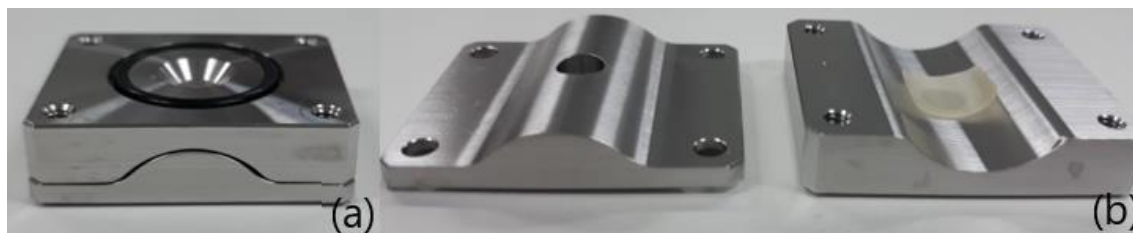
A cinética de liberação do CPO das formulações foi realizada em uma célula de difusão vertical (PermeGear Inc. Bethelhem, PA, EUA) com área difusional de 0,65 cm^2 . O compartimento receptor foi completamente preenchido com 5mL de PBS pH = 7,4.

No compartimento doador foram aplicados 10 μL de cada formulação sobre a membrana, equivalente a 1,23mg e 2,46mg de CPO por centímetro quadrado para as formulações contendo 8% e 16% de CPO, respectivamente. As células foram mantidas sob agitação magnética constante (300 rpm) e temperatura a $32 \pm 1^\circ\text{C}$ com banho circulante de água. A coleta (0,5 mL) do líquido receptor foi realizada nos tempos: 0,08, 0,16, 0,33, 0,5, 0,75, 1, 2 e 4h, e substituída por líquido receptor fresco. As amostras foram filtradas e analisadas por CLAE-DAD.

As comparações entre as formulações foram feitas por ANOVA one-way, post-hoc Bonferroni. O nível de significância estatística foi estabelecido em $p < 0,05$.

O estudo de permeação ungueal do CPO foi realizado em uma célula de difusão vertical (PermeGear Inc. Bethelhem, PA, EUA) com adaptador ungueal (Figura 23a) com área difusional de 0,196 cm^2 . O compartimento receptor foi completamente preenchido com 5mL de BPS pH = 7,4 contendo 30mg/L de azida sódica para prevenir o crescimento microbiano. As unhas foram montadas nos adaptadores (Figura 23b) de forma que a face dorsal foi posicionada voltada para o compartimento doador e a face ventral estava em contato direto com o líquido receptor sem formação de bolhas. As células foram incubadas a 32°C , e o experimento teve duração de 14 dias.

Figura 23 – Adaptador ungueal PermeGear para as células de Franz (a) e montagem da unha no adaptado (b).



Fonte: a autora.

No primeiro conjunto de estudos, dose múltipla em unhas não poradas (MD-NP), 10 μ L de formulação (equivalente a aproximadamente 4,1 mg/cm² e 8,2 mg/cm² de CPO para formulações contendo 8 e 16% do ativo respectivamente) foram aplicados a cada 24 horas nas unhas após o procedimento de limpeza com duas hastes flexíveis de algodão (Johnson's®).

No segundo conjunto de estudos, dose única em unhas microporadas (SD-MP), foi aplicado 50 μ L de formulação (equivalente a aproximadamente 20,41 mg/cm² e 40,82 mg/cm² de CPO para formulações contendo 8 e 16%, respectivamente) mediante uma única aplicação no primeiro dia do ensaio.

Em ambos os experimentos o compartimento doador foi ocluído com Parafilm®, as células foram incubadas a $32 \pm 1^\circ\text{C}$ durante 14 dias e o compartimento receptor agitado magneticamente (IKA®). 0,5 mL do líquido receptor foram amostrados após 7 dias e no final dos experimentos (14 dias). As amostras foram filtradas (Millipore® 0,45 μ m) e analisadas pelo método descrito anteriormente (HPLC-DAD). Além disso, ao final dos estudos de permeação, as unhas foram avaliadas quanto a retenção do fármaco.

As comparações entre as formulações foram feitas por ANOVA one-way, post-hoc Bonferroni e teste t-student não pareado. O nível de significância estatística foi estabelecido em $p < 0,05$.

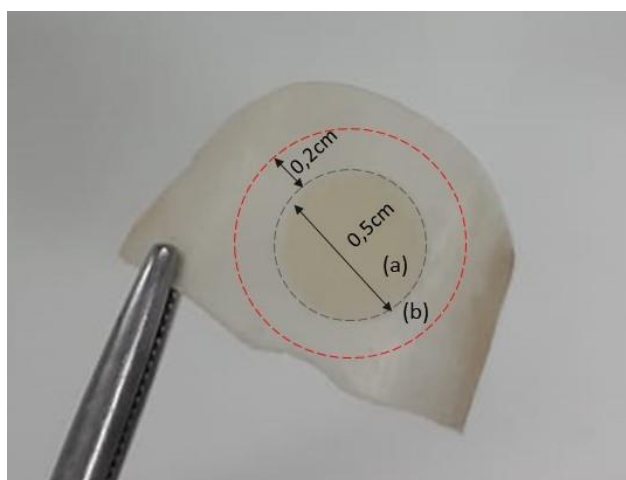
Tanto nos estudos de liberação como de permeação, as condições *sink* foram mantidas, uma vez a solubilidade do CPO no PBS pH = 7,4 é aproximadamente 20mg/mL.

4.8.3 Avaliação de retenção ungueal

As unhas foram retiradas dos adaptadores e limpas com auxílio de dois swabs embebidos com álcool isopropílico (Biosoma[®], Lote: LM033B17) para remoção total da formulação residual. A área circular central demarcada pela área difusional (Figura 24) foi recortada; a espessura avaliada com auxílio de paquímetro digital (150mm-ZAAS); pesada e posteriormente picotada em pequenos pedaços que foram colocados em microtubos com solução extratora (1 mL de solução etanol:água 70:30). Os microtubos foram hermeticamente fechados e a extração do fármaco da unha foi realizada agitando estes tubos em temperatura ambiente por 7 dias em mesa agitadora (MA 562 - Marconi), conforme metodologia proposta por CHIU (2015). Ao final, as soluções foram filtradas (0,45 μm) e analisadas por CLAE-DAD.

Para avaliação da difusão lateral, um comprimento de aproximadamente 0,2 cm ($\sim 0,44\text{cm}^2$ de área) ao redor da área circular foi cortado e submetido ao mesmo procedimento de extração citado anteriormente.

Figura 24 – Unha após estudo de permeação.



(a) Área difusional ($0,196\text{cm}^2$). (b) Área de difusão lateral ($0,190\text{cm}^2$).

Fonte: a autora.

4.9 AVALIAÇÃO ANTIFÚNGICA *IN VITRO* DAS FORMULAÇÕES

Foi utilizado o método descrito por Sleven *et al.* (2015), com modificações (Figura 25). A extremidade inferior de um frasco de vidro (Vial Sigma-Aldrich®) foi cortada para que pudesse ser usada como um “compartimento doador” para as formulações testadas. Todo o material utilizado foi autoclavado a 121°C por 15 minutos antes da montagem do sistema. As unhas com e sem poros foram limpas com swab de álcool isopropílico (Biosoma®).

Todo procedimento de montagem a seguir foi realizado em cabine de segurança biológica. A unha foi montada na abertura (5 mm de diâmetro) da tampa do frasco (polipropileno) com a face dorsal voltada para cima; um anel de borracha foi colocado na superfície ventral da unha para evitar vazamento e, em seguida, a tampa foi rosqueada no frasco até completa vedação da unha entre o vial e sua tampa (Figura 25A). O conjunto foi colocado em contato direto com ágar Sabouraud dextrose (SDA) que simulou o leito ungueal (Figura 25B) localizado no fundo de um béquer de vidro de 50 mL e o conjunto fechado com Parafilm®.

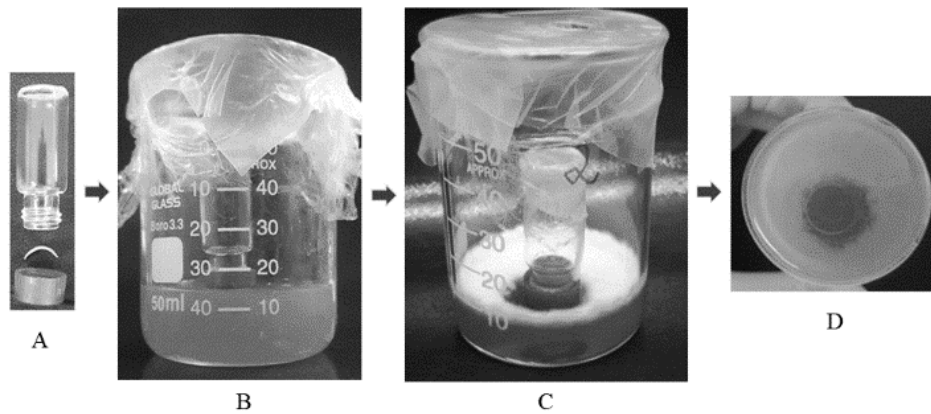
Para a etapa de pré-carga, uma dose única de 50 µL das formulações foi aplicada na superfície dorsal das unhas. Após incubação por 14 dias em estufa a $36,5 \pm 1^\circ\text{C}$, o conjunto frasco-unha foi transferido para um meio de ágar Sabouraud dextrose (SDA) contaminado com *T. rubrum* recém-inoculado (isolado clínico, cód. URM 6206, da coleção interna fornecido pelo Laboratório de Micologia Médica Sylvio Campos do Centro de Biociências – CB/UFPE) conforme Figura 25C e mantidos por mais 7 dias, incubados em estufa a $36,5 \pm 1^\circ\text{C}$. Em seguida, verificou-se a formação de halo de inibição no meio contaminado (Figura 25D).

A inibição percentual foi calculada como a área do halo de inibição em relação à área total de crescimento potencial. A área da zona de inibição foi estimada como a de um círculo com o diâmetro medido com um Paquímetro Digital e a área total de crescimento do fungo que foi de 11,94 cm² em todos os casos (referente a área interna do béquer usado). Quando um halo de inibição foi formado, uma etapa adicional foi realizada para verificar a vedação do conjunto. Para isso, ao final do experimento, o conjunto frasco-unha foi transferido para um novo ágar não inoculado e 400 µL de solução aquosa de azul de metileno a 1% adicionados ao compartimento doador por mais 7 dias para verificar se houve vazamento do corante para o ágar localizado abaixo da unha.

Quando não havia formação de halo de inibição, foi realizado exame micológico direto nas unhas (DOS SANTOS; COELHO; NAPPI, 2002; LACAZ *et al.*, 2002). Quando as principais estruturas fúngicas não foram encontradas na avaliação microscópica do exame

direto, as amostras de fragmentos desta unha foram cultivadas em ágar micosel (meio seletivo para fungos dermatófitos) para verificar o potencial de crescimento de *T. Rubrum*.

Figura 25 – Configuração do ensaio microbiológico *in vitro* usado neste trabalho conforme adaptado de Sleven et al. (2015). (A): conjunto unha-frasco antes do fechamento, (B): conjunto frasco-unha colocado em meio de ágar durante a etapa de pré-carga, (C): conjunto frasco-unha colocado em meio contaminado e (D): imagem representativa do halo de inibição formado.



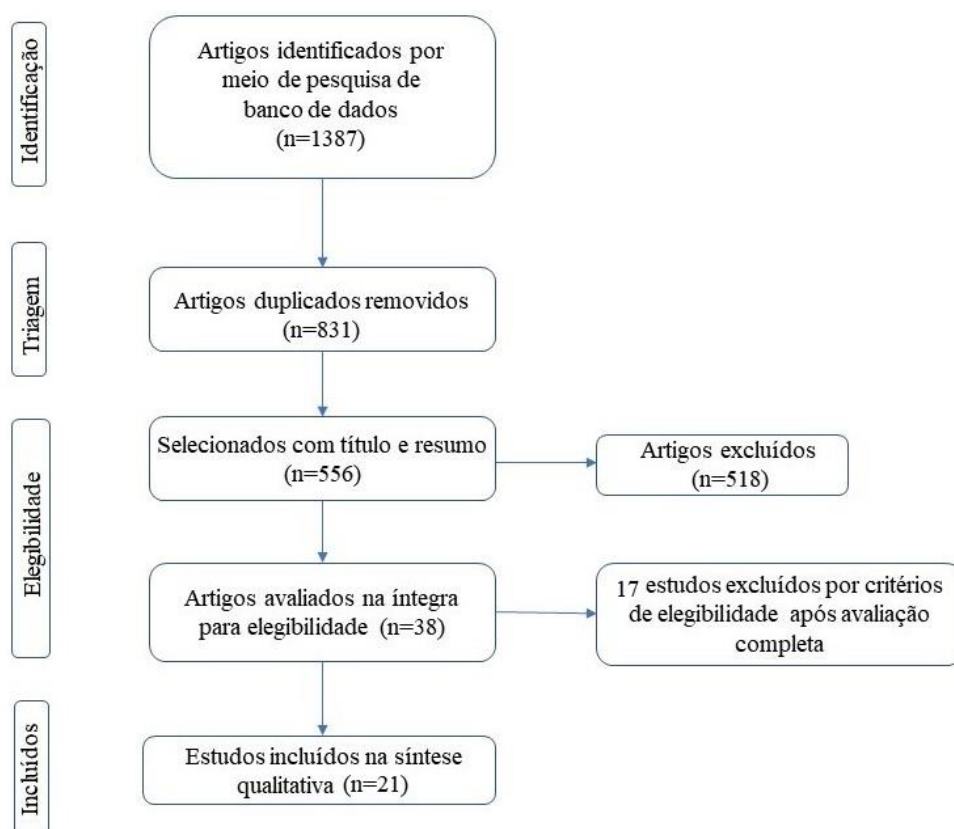
Fonte: a autora.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 REVISÃO SISTEMÁTICA

A busca nas bases de dados resultou em um total de 1387 artigos, dos quais 831 se repetiram, restando 556 artigos. Após a leitura dos títulos e resumos, foram excluídos 518 artigos. Desta forma, 38 artigos foram selecionados para leitura na íntegra. Subsequente à avaliação crítica das publicações, com base nos critérios previamente descritos, foram selecionados 21 artigos (Figura 26).

Figura 26 – Esquema da seleção de artigos.

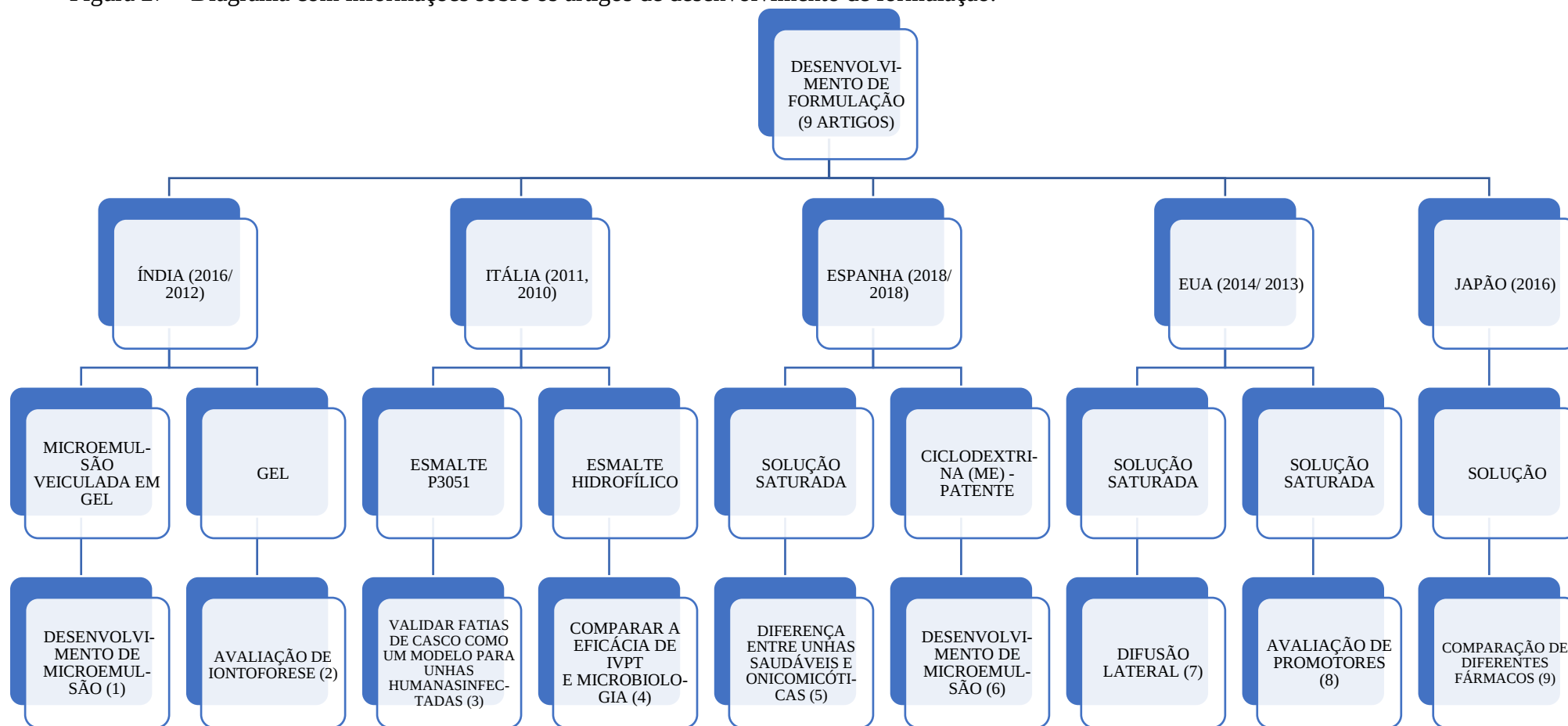


Fonte: a autora.

Todos os 21 artigos selecionados utilizam o estudo de permeação *in vitro* (IVPT) das unhas para avaliar o ciclopírox. Dentre eles, 9 artigos analisam apenas formulações desenvolvidas (Figura 27); 8 artigos, além de trazer inovação no desenvolvimento de formulações, também fazem avaliação comparativa com o produto de referência (esmaltes antifúngicos) disponível no mercado nacional, a depender do país onde o estudo foi realizado

(Figura 28). Nos 4 artigos restantes foi utilizado o esmalte antifúngico referência para, por meio do IVPT, avaliar um parâmetro diferente como um novo teste, dispositivo ou técnica (Figura 29).

Figura 27 – Diagrama com informações sobre os artigos de desenvolvimento de formulação.



Fonte: a autora.

1 (CHOUHAN; SAINI, 2016b)

2 (NAIR *et al.*, 2013)

3 (MONTI *et al.*, 2011)

4 (MONTI, D. *et al.*, 2010)

5 (CUTRÍN GÓMEZ *et al.*, 2018)

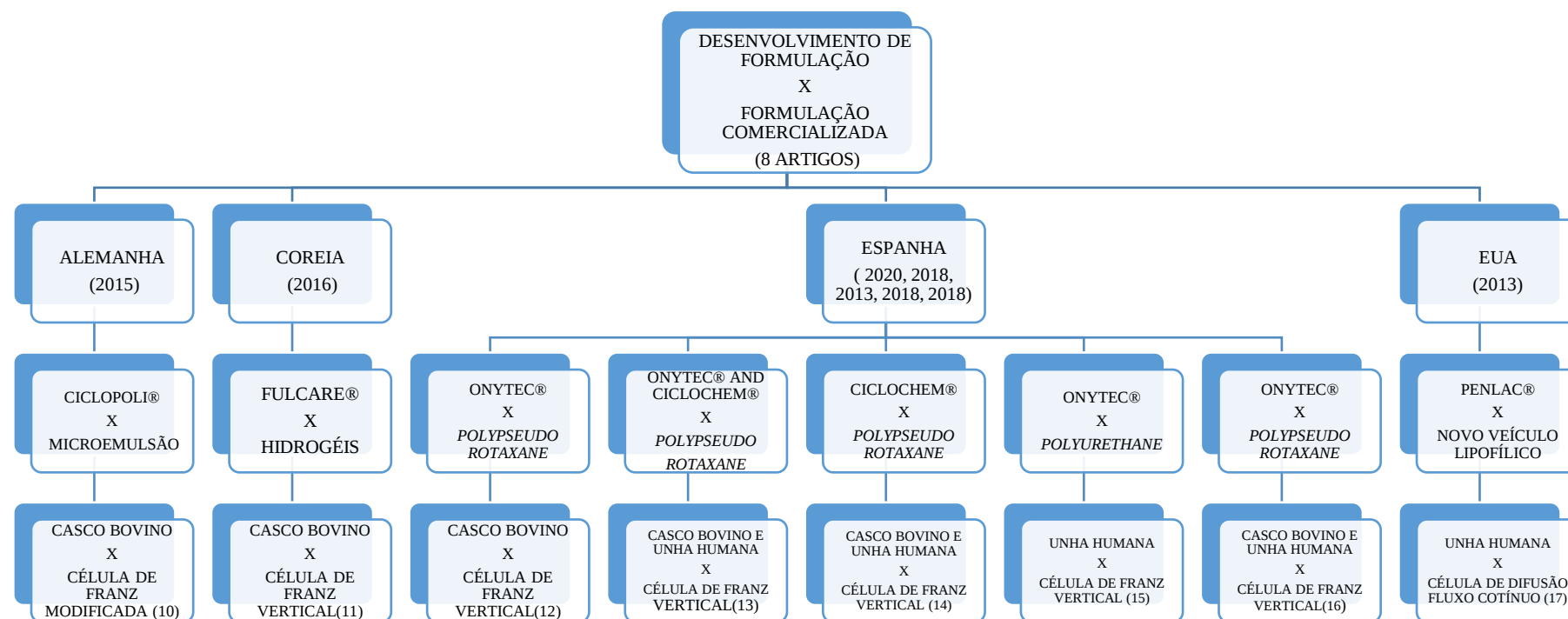
6 (GÓMEZ *et al.*, 2018b)

7 (PALLIYIL, BIJI B. *et al.*, 2014)

8 (PALLIYIL, BIJI; LEBO; PATEL, 2013)

9 (MATSUDA *et al.*, 2016)

Figura 28 – Diagrama com informações sobre os artigos de desenvolvimento de formulação comparadas a formulações comercializadas.



Fonte: a autora.

10 (TÄUBER; MÜLLER-GOYMANN, 2015)

11 (THAPA et al., 2016)

12 (CUTRÍN-GÓMEZ et al., 2020)

13 (CUTRÍN-GÓMEZ et al., 2018a)

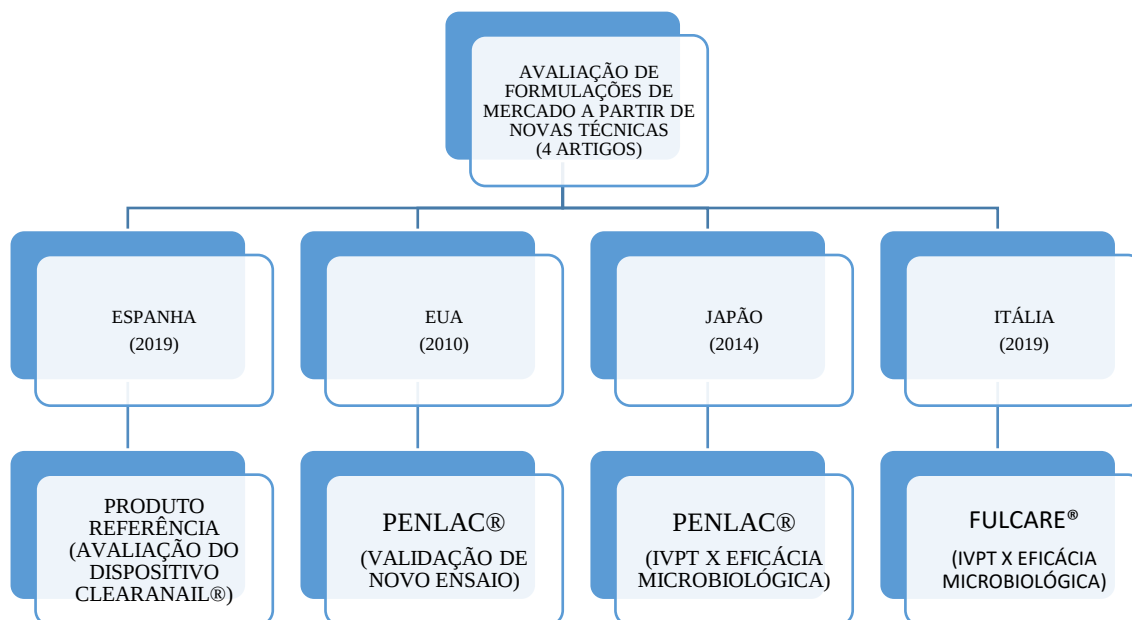
14 (NOGUEIRAS-NIETO, LUIS; BEGOÑA DELGADO-CHARRO; OTERO-ESPINAR, 2013)

15 (VALDES et al., 2018)

16 (CUTRÍN-GÓMEZ et al., 2018b)

17 (HAFEEZ et al., 2014)

Figura 29 – Diagrama com informações sobre os artigos de avaliação de formulação do mercado, utilizando novas técnicas.



Fonte: a autora.

18 (DÍAZ *et al.*, 2019)

19 (BU *et al.*, 2010)

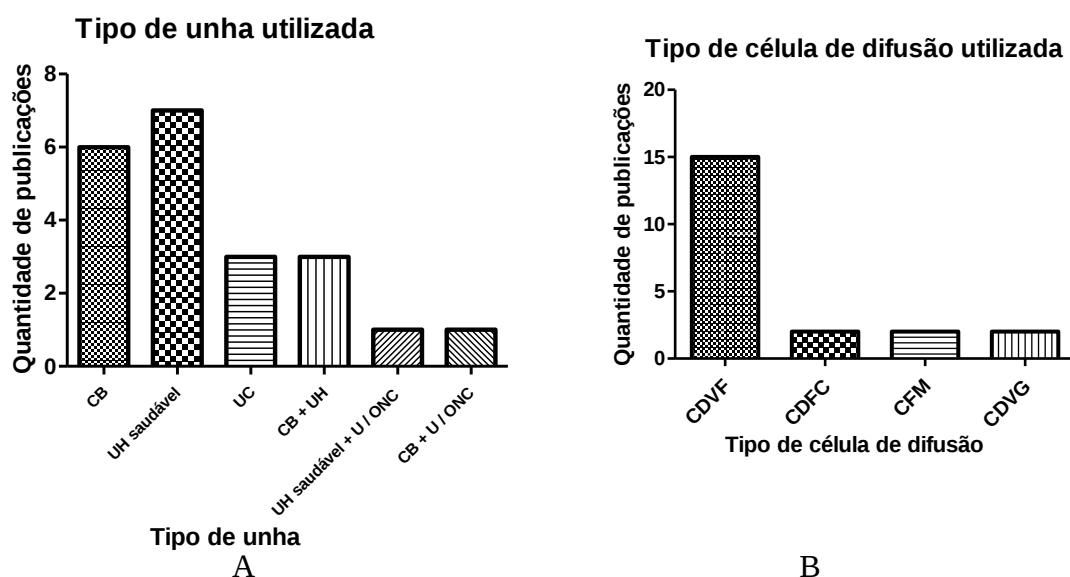
20 (SUGIURA *et al.*, 2014)

21 (MONTI *et al.*, 2019)

Após a leitura criteriosa de todos os artigos, a correlação dos resultados foi dificultada devido à falta de padronização dos diferentes parâmetros do procedimento de permeação, como pode ser verificado nos gráficos 1A e 1B. A aplicação do produto foi realizada em dose única (16 artigos) ou multidoses seja com aplicação diária ou semanal, e duração de estudo entre 30h e 42 dias.

Como pode ser observado no Gráfico 1B, em 70% dos estudos com CPO, foi utilizado a célula de difusão vertical de Franz. Mesmo assim, a relação quantidade/área de produto aplicada é muito diferente, podendo ser consideradas tanto doses finitas quanto infinitas.

Gráfico 1 – Distribuição dos tipos de unha e de células utilizadas nos trabalhos.



CB- Casco Bovino. UH- Unha humana. UC- Unha de Cadáver. U/ONC- Unha humana saudável + unha onicomicótica. CDVF- Célula de Difusão Vertical de Franz. CDFC- Célula de Difusão de Fluxo Contínuo. CFM- Célula de Franz Modificada. CDVG- Célula de Difusão Vertical Modificada do tipo Gummer.

Fonte: a autora.

Considerando o país do primeiro autor de cada publicação, como o país de desenvolvimento do estudo, pode-se dizer que, de acordo com a Figura 30, a Espanha é o país com maior número de publicações na área de produtos ungueais contendo Ciclopirox.

No entanto, é possível também evidenciar que dentre as 8 publicações, 7 delas foram realizadas pelo mesmo grupo de pesquisa, dentre os quais 6 trabalhos investigaram o melhoramento de um mesmo produto desenvolvido a base de *polypseudo rotaxanes*, e um estudo veiculou CPO em polímero de poliuretano (PU-19) desenvolvido anteriormente por Gregorí Valdes *et al.* (2017) em Portugal. Até então, os poliuretanos nunca tinham sido usados em esmaltes terapêuticos para unhas.

As 3 publicações da Itália também foram feitas por um único grupo de pesquisa, e 2 dentre 4 publicações dos estados unidos são também de uma única equipe.

5.2 ESTUDO DE SOLUBILIDADE DO CICLOPIROX OLAMINA

O desenvolvimento de qualquer tipo de formulação depende, primordialmente, das propriedades físico-químicas do fármaco, das características da via de administração, um direcionador para seleção da forma farmacêutica mais conveniente, bem como em virtude das características da patologia a ser tratada.

Fármacos lipofílicos, são preferencialmente solubilizados em solventes hidrofóbios e isso justifica, fortemente, o porquê dos esmaltes utilizados no tratamento da ONC, serem preparados com uma mistura de solventes orgânicos. Estes facilmente evaporam, deixando na placa ungueal o fármaco cristalizado que é incapaz de particionar ou difundir para o leito ungueal (LIPNER, 2019).

Neste sentido, diferentes formas farmacêuticas têm sido desenvolvidas no intuito não só de aumentar a eficácia dos medicamentos a serem utilizados topicamente no tratamento da ONC bem como na diminuição das recidivas. Para isto, um primeiro passo seria a busca na literatura e/ou a avaliação da solubilidade do fármaco em diferentes solventes, como pode ser observado na tabela abaixo.

Tabela 5 – Solubilidade de CPO em diferentes meios. O asterisco (*) indica os veículos selecionados para o desenvolvimento das formulações de gel e termogel.

Componente	Solubilidade (mg/mL)
Cremophor EL	17,01 ± 5,34
Tween 20	21,03 ± 1,70
Ácido oleico	46,89 ± 10,48
Isopropanol (IP)	195,93 ± 21,13
Água	23,40 ± 2,58
Tween 80	16,88 ± 0,27
Propilenoglicol	283,80 ± 37,75
Miristrato de isopropila	3,20 ± 0,51
Dietilenoglicol monoetil éter (DEGEE)-Transcutol	130,42 ± 10,20
Acetato de etila	3,62 ± 0,24
Labrafac	4,06 ± 0,25
PBS	25,54 ± 1,11

Água: Isopropanol (50:50) (p/p)	468,88 ± 31,00
*Água: Isopropanol (30:70) (p/p)	526,26 ± 54,00
Água: Isopropanol (10:90) (p/p)	429,42 ± 34,77
*Água: Isopropanol: Propilenoglicol (33:33:33) (p/p)	419,59 ± 79,40
Água: Isopropanol: Propilenoglicol (25:50:25) (p/p)	470,37 ± 25,11
Água: Isopropanol: Propilenoglicol (15:70:15) (p/p)	443,50 ± 46,85
*Água: Isopropanol: Transcutol (33:33:33) (p/p)	379,71 ± 15,22
Água: Isopropanol: Transcutol (25:50:25) (p/p)	382,63 ± 32,26
Água: Isopropanol: Transcutol (15:70:15) (p/p)	420,64 ± 31,61
*Água: Isopropanol: Transcutol: Acetato de etila (16,65:33:33:16,65) (p/p)	224,20 ± 34,08

Fonte: a autora.

Utilizando os solventes que apresentaram maior solubilidade para o CPO, foram realizados novos testes de solubilidade com misturas binárias e ternárias visando selecionar a melhor mistura de solventes para a etapa de desenvolvimento dos géis e termogéis. Vale salientar que, em virtude da unha ser uma barreira mais hidrofílica do que a pele (WALTERS; FLYNN, 1983; WALTERS; FLYNN; MARVEL, 1985), e as células queratinizadas quando hidratadas se comportarem como uma matriz de gel hidrofílica, onde o ativo pode se difundir com menos resistência, a água foi o único solvente mantido em todas as formulações testadas. A água age como um promotor de penetração que hidrata a unha e conduz a um aumento da penetração do fármaco (BHUPTANI; DESHPANDE; PATRAVALE, 2016).

5.3 DESENVOLVIMENTO DAS FORMULAÇÕES UNGUEAIS DE CICLOPIROX OLAMINA

De acordo com Murdan (2002), em virtude da baixa permeabilidade das placas ungueais, algumas estratégias se tornam importantes no sentido de otimização da terapia tópica. Entre elas estão o uso de fármacos potentes e/ ou com propriedades físico-químicas adequadas para permeação na lâmina ungueal; uso, na formulação, de promotores de permeação; formulação de fácil administração e que permaneça em contato com a lâmina ungueal por longos períodos.

Dito isto e considerando o objetivo geral do trabalho “Desenvolver e avaliar o desempenho de formulações ungueais simples, de baixo custo e mais eficazes que aquelas disponíveis comercialmente contendo ciclopirox olamina para tratamento de onicomicoses”,

foram preparadas formulações geleificadas contendo os polímeros HPMC e poloxamer utilizando as misturas binárias e ternárias testadas anteriormente (Tabelas 6 e 7).

Tabela 6 - Composição centesimal dos géis desenvolvidos.

Componentes	Composição (% p/p)										
	GH1	GH2	GH3	GH4	GH5	GH6	GP1	GP2	GP3	GP4	GP5
CPO	8	16	16	16	8	16	8	16	16	16	16
HPMC	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	-	-	-	-	-
Poloxamer®	-	-	-	-	-	-	20	20	20	20	20
Água/Isopropanol (30:70)	89,5	81,5	-	83,5	-	-	-	-	-	-	-
Água/Isopropanol/ Propilenoglicol (33:33:33)	-	-	81,5	-	-	-	72	64	62	59	-
Água/Isopropanol/ Transcutol (33:33:33)	-	-	-	-	89,5	81,5	-	-	-	-	62
Ureia	1	1	1	-	1	1	-	-	1	-	1
Hidróxido de potássio	1	1	1	-	1	1	-	-	1	-	1
Lauril sulfato de Sódio	-	-	-	-	-	-	-	-	-	5	-

Fonte: a autora.

Tabela 7 - Composição centesimal das formulações GH6 e suas modificações.

Componentes	Composição (% p/p)					
	GH6	GH6-E	GH6-G	GH6-GK	GH6-GL	GH6-GP
CPO	16	16	16	16	16	16
HPMC	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
Água/Isopropanol/ Transcutol (33:33:33)	81,5	-	-	-	-	-
PBS/ Isopropanol/Transcutol/Acetato de etila (16,65:33:33:16,65)	-	82,4	-	-	-	-
Água/Isopropanol/Transcutol/Acetato de etila (16,65:33:33:16,65)	-		82,4	81,5	78,5	76,5
Álcool cetosteárilico/ Lanette N	-	-	-	-	3	-
Álcool cetosteárilico/Polisorbato 60 (Polawax NF)	-	-	-	-	-	5
Span 80	-	-	-	-	-	20 gotas
Tween 80	-	-	-	-	30 gotas	-
Urea	1	1	1	1	1	1
Hidróxido de potássio	1	0,1	0,1	1	1	1

Fonte: a autora.

Adicionalmente, foram incorporados alguns outros excipientes, como promotores de permeação e agente alcalinizante (descritos na literatura científica como potencializadores na permeação de CPO) (THAPA *et al.*, 2016), entre eles a ureia, lauril sulfato de sódio e KOH, respectivamente, conforme demonstrado na Tabela 6.

As formulações apresentadas nas tabelas 6 e 7 permaneceram macroscopicamente estáveis (sem precipitados e/ou alteração de cor) ao longo de 6 meses em temperatura ambiente. Inicialmente, foram preparadas formulações com 8% do fármaco (p/p), mesma concentração do produto comercial. No entanto, de acordo com a solubilidade do fármaco (Tabela 5) nas misturas de solventes selecionadas como base para os géis, outras formulações incorporando 16% do fármaco foram preparadas, e incluindo diferentes concentrações de álcool cetearílico/cetearilsulfato de sódio, cetearil álcool/polissorbato 60, monooleato de sorbitano e monooleato de polioxietileno sorbitano (Tabela 7).

5.4 CARACTERIZAÇÃO DAS FORMULAÇÕES

A tabela 8 mostra as características organolépticas, pH e teor de CPO (média $\pm$ DP) das formulações. Logo após o preparo, as formulações foram doseadas e apresentaram a concentração de CPO dentro do limite especificado para formulações tópicas (90-110%).

Tabela 8 - Características organolépticas, pH e teor de CPO (média $\pm$ DP) das formulações.

Formulações	Consistência	Cor	Odor	pH	Teor de CPO (%)
GH1	Líquida	Incolor	Residual de isopropanol	12,5 $\pm$ 0,02	98,37 $\pm$ 0,07
GH2	Líquida	Levemente amarelada	Residual de isopropanol	12,4 $\pm$ 0,03	108,18 $\pm$ 0,025
GH3	Líquida	Levemente amarelada	Residual de isopropanol	12,7 $\pm$ 0,04	100,37 $\pm$ 0,027
GH4	Líquida	Incolor	Residual de isopropanol	10,8 $\pm$ 0,01	104,83 $\pm$ 0,02
GH5	Líquida	Incolor	Residual de isopropanol	12,3 $\pm$ 0,07	106,1 $\pm$ 0,015

GH6	Líquida	Levemente amarelada	Residual de isopropanol	$12,1 \pm 0,05$	$101,36 \pm 0,036$
GH6-E	Líquida	Incolor	Residual de isopropanol	$10,6 \pm 0,01$	$100,65 \pm 0,078$
GH6-G	Líquida	Incolor	Residual de isopropanol	$10,9 \pm 0,02$	$102,10 \pm 0,068$
GH6-GK	Líquida	Incolor	Residual de isopropanol	$12,5 \pm 0,03$	$99,75 \pm 0,087$
GH6-GL	Líquida	Incolor	Residual de isopropanol	$12,8 \pm 0,01$	$99,95 \pm 0,058$
GH6-GP	Líquida	Incolor	Residual de isopropanol	$12,3 \pm 0,02$	$102,02 \pm 0,074$
GP1	Líquida levemente viscosa	Incolor	Residual de isopropanol	$11,1 \pm 0,01$	$103,45 \pm 0,11$
GP2	Líquida levemente viscosa	Levemente amarelada	Residual de isopropanol	$10,8 \pm 0,05$	$109,5 \pm 0,17$
GP3	Líquida levemente viscosa	Levemente amarelada	Residual de isopropanol	$12,3 \pm 0,02$	$107,88 \pm 0,035$
GP4	Líquida levemente viscosa	Levemente amarelada	Residual de isopropanol	$10,5 \pm 0,01$	$99,97 \pm 0,33$
GP5	Líquida levemente viscosa	Levemente amarelada	Residual de isopropanol	$12,9 \pm 0,01$	$100,01 \pm 0,04$
MICOLAMINA®	Líquida	Levemente amarelada	Residual de solventes orgânicos	5*	$107,3 \pm 0,04$

* com uso de papel indicador de pH (MQuant®-Merck).

Fonte: a autora.

Com relação ao pH, as formulações contendo o KOH e ureia apresentaram os maiores valores, entre 11-13, o que era esperado, em virtude do uso do agente alcalinizante. No entanto, as demais preparações, mesmo sem a adição do KOH, apresentaram pH igual a 10. Os seus

respectivos placebos apresentaram pH em torno de 6,5, tornando claro que o fármaco é o responsável pelo aumento do pH de todas as formulações. Considerando que a Micolamina, mesmo com 8% de CPO apresenta pH igual a 5 e verificando que a simples solubilização do CPO em água já torna esta solução fortemente básica, chegamos à conclusão de que a interação água/ CPO é a resposta para o aumento de pH. Salientando que a Micolamina® não tem água em sua composição.

De acordo com Thapa *et al.*, (2016), a permeação do CPO aumentou quando do uso de uma formulação com pH 10,8, quando comparado com a mesma formulação com pH 3 e 9. Em condições de pH extremamente alcalinas a hidratação da unha é significativamente aumentada. A hidratação, por sua vez, aumenta a porosidade da unha, aumentando assim, a difusividade do fármaco (ELSAYED, 2015; SMITH; HAO; LI, 2010).

5.5 VALIDAÇÃO DO MÉTODO ANALÍTICO POR CROMATOGRAFIA LIQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA COM DETECÇÃO DE ARRANJO DE DIODOS (CLAE–DAD)

O grupo N-hidroxilpiridona contido na molécula do CPO interage fortemente com traços de íons metálicos em solventes e sistemas de ensaio, e com adsorventes presentes nas colunas à base de sílica gel através de um efeito quelante, resultando em severa cauda cromatográfica e respostas não lineares da área do pico vs. concentração de CPO, tornando a determinação direta do fármaco um desafio (LEHR; DAWN, 1985).

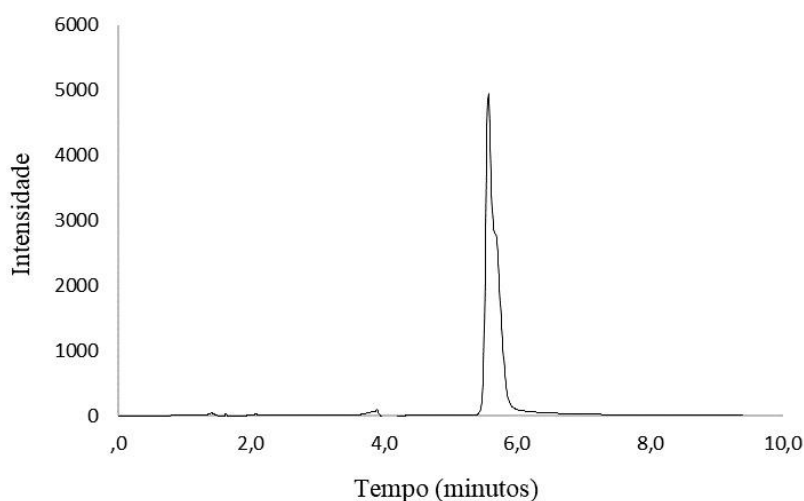
Inicialmente, tentamos reproduzir metodologias analíticas encontradas na literatura científica. Apesar da maior parte dos trabalhos realizarem a quantificação de CPO através de métodos incluindo a etapa de derivatização (ESCARRONE *et al.*, 2008), devido o comportamento do fármaco como um agente quelante, era do nosso interesse trabalhar com um método direto. Diante disso, tentamos reproduzir a metodologia de quantificação utilizando detecção por espectrometria de massas MS/MS publicado por (BU *et al.*, 2010). Não obtivemos sucesso, uma vez que o pico cromatográfico referente ao fármaco não foi detectado.

Outros métodos trazem o uso de EDTA na fase móvel, um outro agente quelante, na tentativa de suprimir a propriedade quelante do CPO (CHOUHAN; SAINI, 2016a). A concentração de EDTA relatada nos trabalhos é de 0,96g/L, no entanto, utilizando essa concentração de EDTA, tivemos o entupimento do sistema cromatográfico e a perda de pré-coluna e coluna cromatográfica devido à alta molaridade da solução.

Outra informação descrita na literatura é o uso de ácido na fase móvel, para melhora do formato do pico, sendo o ácido acético (CHOUHAN; SAINI, 2016b), e ácido fosfórico (THAPA *et al.*, 2016) os mais relatados. Diante disso, foram realizados testes preliminares com uso de diferentes concentrações de EDTA e diferentes ácidos. A melhor condição encontrada foi utilizada, como descrito no item 4.7 e seguida para validação do método.

O método desenvolvido para quantificação da Ciclopirox Olamina (CPO) mostrou seletividade, linearidade, precisão e exatidão de acordo com o especificado na Resolução RDC nº 166, de 24 de julho de 2017. O cromatograma apresentado na Figura 31, mostra o tempo de retenção do fármaco em aproximadamente 6,2 minutos. Os limites de detecção e quantificação foram de 3,06 e 9,28 µg/mL, respectivamente, para amostras em tampão fosfato, calculados a partir do desvio padrão dos resíduos (63785,8292) e do coeficiente angular (68704).

Figura 31 - Cromatograma referente ao ponto 100 µg/mL.



Fonte: a autora.

5.5.1 Seletividade

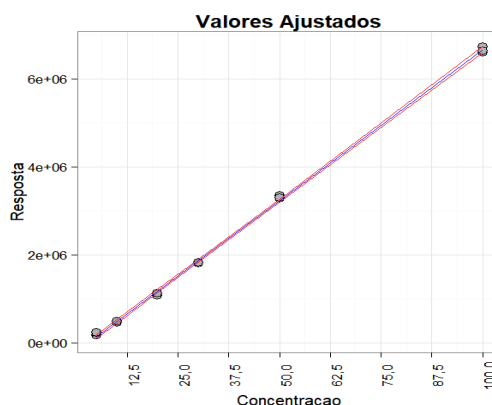
Quanto à seletividade, a análise das amostras de fase móvel; tampão fosfato salino (PBS) pH 7,4; PBS com azida sódica (30mg/L); branco de unha humana (Figura 30) preparado conforme descrito em 4.7 e solução extratora de unha (etanol:água 70:30) não evidenciaram presença de sinal interferente no tempo de retenção do CPO, demonstrando que os constituintes do eluente, os líquidos receptores dos ensaios de liberação *in vitro* e permeação *ex vivo* bem

como a solução extratora de unha não interferem na quantificação do CPO. Logo, a metodologia se apresenta seletiva para estas condições.

5.5.2 Linearidade

Os resultados do estudo de linearidade foram avaliados quanto ao coeficiente angular, coeficiente de correlação, dispersão dos resíduos e homoscedasticidade dos dados, conforme descritos na RDC 166/17. A Figura 32 mostra a representação gráfica das respostas em função da concentração do analito e a Tabela 9 o resumo dos resultados das avaliações estatísticas com nível de significância de 5%. A equação da reta obtida pelo modelo é $y = 68704,1(67714,3 - 69693,9) x - 200373,8 (-248058,4 - 152689,3)$.

Figura 32 - Representação gráfica das respostas em função da concentração do analito.



Fonte: a autora.

Tabela 9 - Resultados das avaliações estatísticas realizadas.

Teste	Conclusão
Teste F da ANOVA	Rejeitamos a hipótese de coeficiente angular ser zero.
Teste do intercepto	Intercepto significativo
Coeficiente de Correlação de Pearson	$R = 0,9996 > 0,990$ (existe uma relação linear adequada).
Teste de Normalidade dos Resíduos	Não rejeitamos a hipótese de normalidade dos resíduos.
Teste de Homocedasticidade	Modelo homocedástico.

Fonte: a autora.

O resultado da análise do coeficiente angular mostrou que como P-valor (0) do teste F da ANOVA é menor que 0,05 (conforme especificado) rejeitamos a hipótese nula (coeficiente angular zero), demonstrando que o modelo é linear. O coeficiente de correlação obtido (0.9996) é maior que 0.990 (especificado na legislação), concluindo que existe uma relação linear adequada.

A avaliação estatística da distribuição dos resíduos pelo teste de Shapiro-Wilké obteve um P-valor (0,312) maior que 0,05, não rejeitamos a hipótese de normalidade dos resíduos ao nível de significância de 5%. E com P-valor (0,9025) obtido pelo teste de Breusch Pagan é maior que 0,05, não rejeitamos a hipótese de igualdade das variâncias ao nível de significância de 5%. Logo, temos um modelo homocedástico, que demonstra que existe variância constante dos erros experimentais.

Por fim, o método mostrou ser capaz de obter respostas analíticas diretamente proporcionais à concentração de CPO nas amostras.

5.5.3 Precisão e exatidão

Os resultados da precisão ao nível da repetibilidade estão descritos na Tabela 10. Os resultados encontram-se abaixo do especificado no método, que foi o valor de 5% para o DPR.

Tabela 10 - Resultados da Repetibilidade.

Concentração teórica (µg/mL)	Média das concentrações experimentais (µg/mL) (n=5)	Desvio Padrão	Coeficiente de variação (%)
5	5,3427	0,1457	2,7263
10	9,5276	0,0417	0,438
50	47,7541	0,2114	0,4427
80	86,7279	0,3694	0,4259
200	232,8797	0,3496	0,1501

Fonte: a autora.

Já os resultados experimentais e a estatística descritiva da precisão intermediária estão descritos na Tabela 11. O resultado da comparação estatística entre diferentes dias e diferentes analistas para o LIQ, CQB, CQM, CQA e CQD estão nas Tabelas 12, 13, 14, 15 e 16 respectivamente. Os dados descritivos mostram que o maior DPR foi de 3,37%.

Tabela 11 - Dados experimentais da precisão intermediária (analista 1 e analista 2).

Analista 1										
	Dia 1					Dia 2				
	LIQ	CQB	CQM	CQA	CQD	LIQ	CQB	CQM	CQA	CQD
Réplica 1	5,29	9,52	47,9	86,2	232,42	4,95	9,96	49,82	81,66	208,25
Réplica 2	5,23	9,59	47,85	86,5	232,81	4,96	10,13	49,71	82,55	207,43
Réplica 3	5,22	9,54	47,85	86,8	232,71	5,28	9,91	49,88	81,32	210,22
Média	5,25	9,55	47,87	86,5	232,65	5,06	10	49,8	81,84	208,63
DP	0,04	0,04	0,03	0,3	0,2	0,19	0,12	0,09	0,64	1,43
DPR(%)	0,72	0,38	0,06	0,35	0,09	3,71	1,15	0,17	0,78	0,69

Analista 2										
	Dia 1					Dia 2				
	LIQ	CQB	CQM	CQA	CQD	LIQ	CQB	CQM	CQA	CQD
Réplica 1	5,36	9,99	51,34	81,29	231,45	5,8	9,95	51,45	81,87	204,29
Réplica 2	5,69	10,08	51,4	81,63	218,92	5,77	10,14	51,29	80,98	204,29
Réplica 3	5,68	9,86	51,53	81,54	232,46	5,75	10,16	51,79	81,39	202,44
Média	5,58	9,98	51,42	81,49	227,61	5,77	10,08	51,51	81,41	203,67
DP	0,19	0,11	0,1	0,18	7,54	0,03	0,12	0,26	0,45	1,07
DPR(%)	3,37	1,11	0,19	0,22	3,31	0,44	1,15	0,5	0,55	0,52

Fonte: a autora.

Tabela 12 - ANOVA da precisão intermediária do LIQ.

	G.L.	Soma dos quadrados	Quadrados Médios	Estatística F	P-Valor
Dia	1	0,0003	0,0003	0,0031	0,9649
Analista	1	0,805	0,805	7,4837	0,2231
Repetitividade	8	0,1461	0,0183		

Fonte: a autora.

Tabela 13 - ANOVA da precisão intermediária do CQB.

	G.L.	Soma dos quadrados	Quadrados Médios	Estatística F	P-Valor
Dia	1	0,2302	0,2302	2,642	0,3511
Analista	1	0,1914	0,1914	2,1973	0,3778
Repetitividade	8	0,0819	0,0102		

Fonte: a autora.

Tabela 14 - ANOVA da precisão intermediária do CQM.

	G.L.	Soma dos quadrados	Quadrados Médios	Estatística F	P-Valor
Dia	1	3,072	3,0472	1,2008	0,4709
Analista	1	20,7738	20,7738	8,1205	0,2149
Repetitividade	8	0,1703	0,0213		

Fonte: a autora.

Tabela 15 - ANOVA da precisão intermediária do CQA.

	G.L.	Soma dos quadrados	Quadrados Médios	Estatística F	P-Valor
Dia	1	16,8998	16,8998	1,0662	0,4898
Analista	1	22,265	22,265	1,4047	0,4462
Repetitividade	8	1,4561	0,182		

Fonte: a autora.

Tabela 16 - ANOVA da precisão intermediária do CQD.

	G.L.	Soma dos quadrados	Quadrados Médios	Estatística F	P-Valor
Dia	1	1724,0023	1724,0023	129,0294	0
Analista	1	74,9903	74,9903	5,6125	0,042
Repetitividade	9	120,2519	13,3613		

Fonte: a autora.

Na análise estatística, todos os níveis de concentração estudados, exceto o CQD (200µg/mL) obtiveram P-valor do teste da ANOVA maior que 0,05, não rejeitando a hipótese de que o efeito do fator dia e do analista seja nulo, ao nível de significância de 5%, ou seja, o método se mostrou preciso para os dois analistas nos dois diferentes dias testados. No nível CQD, o P-valor foi menor que 0,05, portanto, a hipótese de que o efeito dia e de analista seja nulo foi rejeitada, indicando que neste nível os fatores dia e analista interferem na precisão do método, no entanto de acordo com a natureza das amostras e das análises desse trabalho, não verificamos a necessidade de refazer o nível de diluição (CQD).

No estudo da exatidão do método, verificamos a concordância entre os resultados individuais, obtidos pelo método em estudo, em relação a um valor de referência aceito como verdadeiro, por isso a análise é feita pela recuperação de cada amostra, que resulta da relação entre as concentrações teóricas e experimentais de cada replicata testada.

Para análise da Exatidão aplicamos o teste t-student a fim de avaliarmos uma recuperação de 100%, os resultados experimentais e os dados estatísticos estão descritos nas Tabelas 17 e 18, respectivamente.

Tabela 17 - Dados experimentais da exatidão.

Concentração teórica (µg/mL)	Média da Recuperação (5x) (%)
5	112,89
10	98,64
50	103,07
80	102,01
200	114,99

Fonte: a autora.

Tabela 18 - Dados estatísticos da exatidão.

	Valores
Recuperação	106,32
Desvio Padrão	6,87
Graus de Liberdade	24
Limite Inferior	103,97
Limite Superior	108,67
Limite Inferior (Especificação)	85
Limite Superior (Especificação)	115

Fonte: a autora.

Como o intervalo de confiança para a média está contido dentro da margem de equivalência, concluímos que existe equivalência ao nível de significância de 5%. Logo, a recuperação atende ao critério de aceitação. Todas as recuperações estão dentro da variação definida (20% para o LIQ e 15% para os demais níveis), logo, a recuperação atende ao critério de aceitação.

5.6 ESTUDOS DE CINÉTICA DE LIBERAÇÃO *IN VITRO* (IVRT)

5.6.1 Análise dos perfis de liberação

A Figura 33 e as tabelas 19, 20 e 21 mostram a liberação comparativa (a partir de 3 diferentes tipos de membranas artificiais) entre duas diferentes formulações geleificadas e a Micolamina® contendo 8% do fármaco, por um período de 4 horas. A quantidade cumulativa liberada de CPO através das membranas hidrofílica e de silicone foi significativamente diferente entre a Micolamina® e ambas as formulações geleificadas.

Os ensaios de liberação a partir das membranas de PTFE e silicone forneceram resultados relativamente consistentes com o produto comercial (Micolamina®), liberando cerca de 20% do fármaco em 4 horas e com as formulações de GH1 e GP1 liberando menos de 10% em todos os casos. Ao contrário, o gel e o termogel liberaram mais de 50% da dose em uma hora através das membranas hidrofílicas, enquanto apenas ~6% foram liberados a partir do produto comercializado. No entanto, devido à retrodifusão do solvente que ocorreu quando do uso da membrana hidrofílica, esse tipo de membrana não foi utilizado nos ensaios de liberação adicionais. Além disso, e para fins de avaliação comparativa, foi necessário usar uma membrana através da qual o produto comercializado liberou o fármaco em quantidade suficiente para permitir a comparação com as novas formulações, de modo que tanto as membranas de PTFE quanto as de silicone foram selecionadas para novos testes. Esses resultados indicam e que a escolha da membrana é crítica em ensaios de liberação do fármaco, que são usadas principalmente para fins de controle de qualidade.

Tabela 19 - Média percentual e DP (n = 6) da liberação cumulativa de CPO de formulações através de membranas hidrofílicas (celulose).

Tempo (h)	FORMULAÇÕES DE CPO Cumulativo (%)					
	GP1 (8%)		GH1 (8%)		Microlamina® esmalte (8%)	
	Média	DP	Média	DP	Média	DP
0,08	8,29	4,37	7,03	5,02	0	0
0,16	23,47	4,05	18,65	11,98	0	0
0,33	39,56	5,01	41,32	12,33	0	0
0,50	50,25	4,97	49,33	12,46	0	0
0,75	58,76	5,11	57,05	10,13	0	0
1	64,78	7,02	63,39	6,83	0	0
2	78,33	9,38	77,55	6,46	4,35	1,62
4	78,59	10,05	81,07	5,18	5,95	1,20

Fonte: a autora.

Tabela 20 - Média percentual e DP (n = 6) da liberação cumulativa de CPO de formulações em membranas de silicone.

Tempo (h)	FORMULAÇÕES DE CPO Cumulativo (%)					
	GP1(8%)		GH1(8%)		Microlamina® esmalte (8%)	
	Média	DP	Média	DP	Média	DP
0,08	0	0	0	0	1,06	0,11
0,16	0	0	0	0	2,10	0,39
0,33	0	0	0	0	5,34	1,23
0,50	0	0	0	0	8,79	0,49
0,75	0	0	0	0	12,65	0,83
1	0	0	0	0	16,79	0,56
2	1,53	0,16	0,98	0,08	19,94	0,90
4	2,17	0,25	1,59	0,09	22,15	0,74

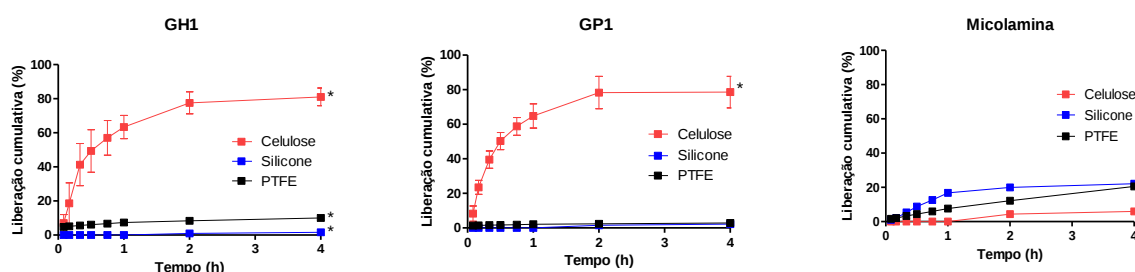
Fonte: a autora.

Tabela 21 - Média percentual $\pm$ DP (n = 6) da liberação cumulativa de CPO de formulações através de membranas hidrofóbicas (PTFE).

Tempo (h)	FORMULAÇÕES DE CPO Cumulativo (%)					
	GP1(8%)		GH1(8%)		Micolamin® esmalte (8%)	
	Média	DP	Média	DP	Média	DP
0,08	1,35	0,07	4,75	0,39	1,61	0,49
0,16	1,46	0,07	5,15	0,44	2,01	0,25
0,33	1,60	0,08	5,65	0,47	3,33	0,42
0,50	1,73	0,06	6,12	0,55	4,37	0,90
0,75	1,91	0,13	6,71	0,40	5,95	1,12
1	2,09	0,25	7,35	0,37	7,62	1,71
2	2,40	0,35	8,38	0,21	12,19	1,71
4	2,86	0,13	10,07	0,88	20,56	1,50

Fonte: a autora.

Figura 33 - Quantidade cumulativa (%) de CPO (média $\pm$ DP, n=6) liberada *in vitro* de GH1, GP1 e esmalte Micolamina® (média $\pm$ DP, n = 6) através de membrana hidrofílica (celulose) e membranas hidrofóbicas (PTFE e silicone). Efeito significativo ($p < 0,05$) para a quantidade total liberada entre diferentes membranas (*) (ANOVA one-way, post-hoc Bonferroni).



Fonte: a autora.

De acordo com Cavalcanti *et al.* (2019), o estudo de liberação *in vitro* (IVRT) é um método para avaliar a qualidade da fabricação dos produtos medicamentosos. Sua inabilidade de se correlacionar com os resultados *in vivo* deve-se, sobretudo, a impossibilidade de obtenção de dados que representem a interação entre a formulação (incluindo os excipientes) e a pele, em particular o estrato córneo (FDA, 1998). E isto claro, torna-se válido também quando se trata de outras membranas biológicas entre elas, a lâmina ungueal.

Dando sequência aos testes, uma série de IVRT foi realizada para todas as formulações com as membranas selecionadas, silicone e PTFE. Os resultados para as formulações de gel de

HPMC e Micolamina® são mostrados na Figura 34 e nas tabelas 22 e 23. Houve diferenças significativas entre o perfil de liberação observado (Figura 34) dependendo da formulação do gel e da membrana utilizada, enquanto, como mencionado acima, a liberação de CPO a partir de Micolamina® foi relativamente independente da membrana utilizada. A porcentagem da dose aplicada liberada através das membranas de silicone pelos produtos em gel foi inferior a 8,5% em todos os casos e significativamente menor e diferente da Micolamina® no estudo de 4 horas. A porcentagem total de CPO liberada do GH4 foi maior e significativamente diferente de outras formulações gelificadas. As membranas de silicone geraram resultados muito semelhantes para todas as formulações de gel sugerindo que a liberação de CPO foi provavelmente controlada por difusão através da membrana. Em contraste, a liberação de CPO a partir dos géis de HPMC foi mais eficiente nas membranas de PTFE, o que permite estabelecer diferenças entre os veículos.

Independentemente do tipo de membrana, não houve diferença entre o percentual total de liberação de CPO de GH3 e GH6. As formulações em gel GH2 e GH4 proporcionaram uma liberação rápida do fármaco (Figura 34), que foi associada a um desempenho pior do IVPT em trabalhos anteriores com tioconazol (FLORES *et al.*, 2018). Entre os que proporcionaram uma liberação mais gradual e contínua estão GH1, GH3, GH4 e GH6, onde este último apresentou os melhores resultados, e seu potencial de otimização foi explorado.

Tabela 22 - Média percentual $\pm$ DP (n = 6) da liberação cumulativa de CPO de formulações em membranas de silicone.

Tempo (h)	FORMULAÇÕES DE CPO Cumulativo (%)													
	Microlamina®		GH1		GH2		GH3		GH4		GH5		GH6	
	8%		8%		16%		16%		16%		8%		16%	
	Média	DP	Média	DP	Média	DP	Média	DP	Média	DP	Média	DP	Média	DP
0,08	1,07	0,11	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
0,16	2,10	0,40	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
0,33	5,34	1,23	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
0,50	8,80	0,50	0	0	0	0	0	0	1,69	0,16	0	0	0,58	0,02
0,75	12,66	0,84	0	0	0	0	0	0	2,02	0,43	0	0	0,97	0,00
1	16,80	0,57	0	0	0	0	0	0	2,58	0,21	0	0	1,20	0,12
2	19,94	0,91	0,98	0,08	1,81	0,24	1,52	0,01	4,25	0,51	1,83	0,04	1,44	0,12
4	22,15	0,93	1,59	0,09	2,72	0,38	1,87	0,14	8,08	0,61	2,58	0,34	1,89	0,04

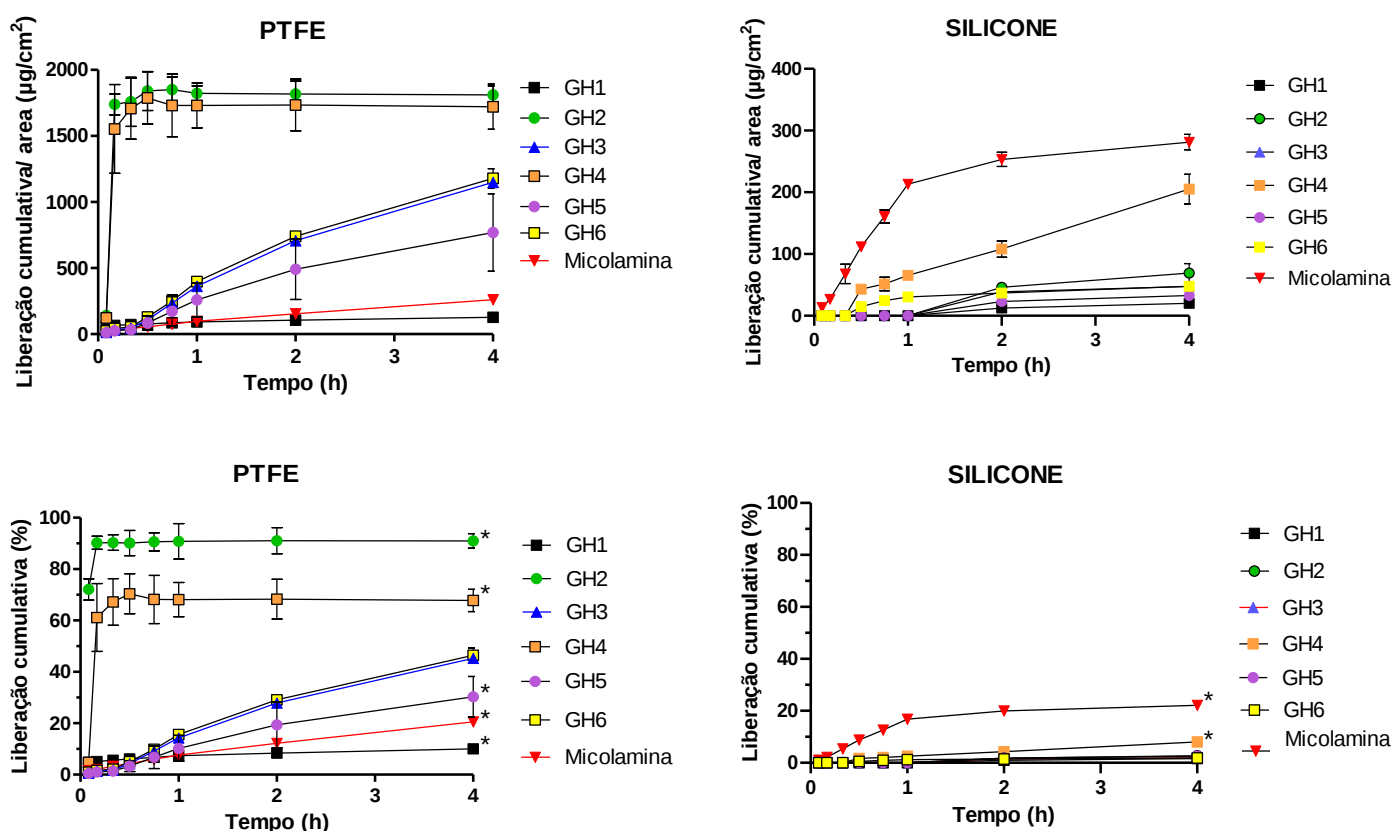
Fonte: a autora.

Tabela 23 - Média percentual $\pm$ DP (n = 6) da liberação cumulativa de CPO de formulações através de membranas hidrofóbicas (PTFE).

Tempo (h)	FORMULAÇÕES DE CPO Cumulativo (%)													
	Micolamina®		GH1		GH2		GH3		GH4		GH5		GH6	
	8%		8%		16%		16%		16%		8%		16%	
	Média	DP	Média	DP	Média	DP	Média	DP	Média	DP	Média	DP	Média	DP
0,08	1,62	0,50	4,75	0,39	72,11	4,13	0,53	0,16	4,81	0,25	0,42	0,23	0,95	0,33
0,16	2,02	0,26	5,15	0,44	90,22	2,54	1,29	0,19	61,16	13,20	1,04	0,59	1,65	0,20
0,33	3,33	0,42	5,65	0,47	90,30	3,05	1,74	0,16	67,21	9,10	1,34	0,70	2,13	0,17
0,50	4,38	0,91	6,12	0,55	90,13	4,90	4,25	0,75	70,41	7,76	3,32	2,11	5,08	0,75
0,75	5,95	1,12	6,71	0,40	90,60	3,52	9,20	1,33	68,18	9,36	6,77	4,39	9,89	1,75
1	7,62	1,71	7,34	0,37	90,77	6,93	14,26	0,26	68,14	6,68	10,23	5,05	15,63	0,50
2	12,19	1,71	8,37	0,21	91,03	5,11	27,87	0,20	68,29	7,71	19,35	8,98	29,15	0,56
4	20,56	1,34	10,07	0,88	90,94	2,82	45,27	0,54	67,79	4,33	30,29	7,91	46,43	2,88

Fonte: a autora.

Figura 34 - Resultados (média $\pm$ DP, n=6) de IVRTs realizados com formulações de gel de HPMC GH1, GH2, GH3, GH4, GH5, GH6 e Micolamina®. Gráficos superiores: quantidade cumulativa liberada através das membranas hidrofóbicas de PTFE (coluna esquerda) e silicone (coluna direita). Gráficos inferiores: porcentagem de CPO liberada em relação à dose aplicada. Os géis GH1, GH5 e Micolamina® continham 8% de CPO enquanto os géis GH2, GH3, GH4 e GH6 continham 16% de CPO. Efeito significativo ($p < 0,05$) para a quantidade total liberada entre diferentes membranas (*) (ANOVA one-way, post-hoc Bonferroni).

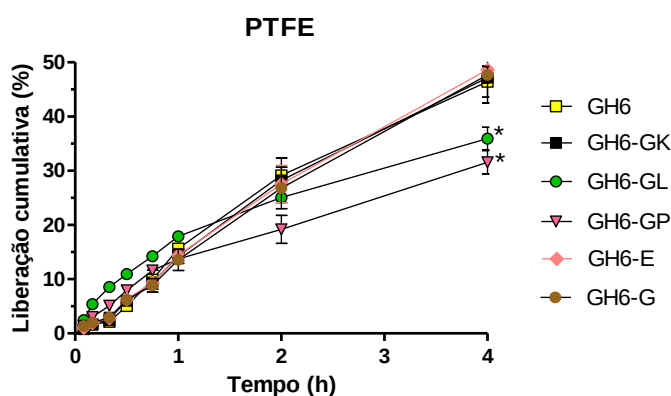


Fonte: a autora.

As modificações consideradas incluíram: redução do teor de hidróxido de potássio (GH6-E e GH6-G); uso de tampão e acetato de etila em substituição da água (GH6-E); adição de acetato de etila (GH6-G, GH6-GK, GH6-GL e GH6-GP); a adição de Lanette N e Tween® 80 (GH6-GL), Polawax NF e Span® 80 (GH6-GP) conforme mostrado na Tabela 8. A Figura 35 e tabela 24 mostram a liberação de CPO através das membranas de PTFE dessas séries de formulações modificadas. Em resumo, foi observada uma diferença estatisticamente significativa e menor entre o CPO liberado das formulações GH6-GL e GH6-GP em relação a

todas as outras, e semelhante entre elas, provavelmente devido ao aumento da viscosidade dessas duas formulações.

Figura 35 - Quantidade cumulativa de CPO (média $\pm$ DP, n=6) liberada *in vitro* dos géis GH6, GH6-GK, GH6-GL, GH6-GP, GH6-E e GH6-G através das membranas de PTFE. Efeito significativo ($p < 0,05$) para a quantidade total liberada entre diferentes membranas (*) (ANOVA one-way, post-hoc Bonferroni).



Fonte: a autora.

Tabela 24 - Liberação cumulativa de CPO (média $\pm$ DP; n = 6) através de membranas de PTFE expressa como porcentagem da dose aplicada a partir de géis GH6, GH6-GK, GH6-GL e GH6-GP, todos contendo 16% de CPO.

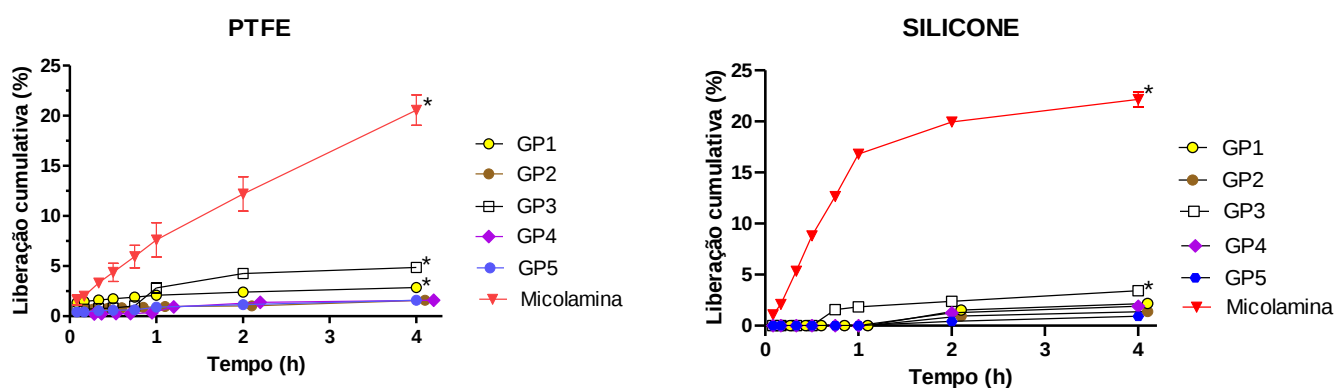
Tempo (h)	FORMULAÇÕES DE CPO											
	Cumulativo (%)											
	GH6		GH6-GK		GH6-GL		GH6-GP		GH6-E		GH6-G	
	Média	DP	Média	DP	Média	DP	Média	DP	Média	DP	Média	DP
0,08	0,95	0,33	0,76	0,06	2,42	0,61	1,40	0,42	1,01	0,22	1,29	0,33
0,16	1,65	0,20	1,65	0,49	5,39	0,97	3,03	0,92	1,90	0,33	1,91	0,29
0,33	2,13	0,17	2,65	1,18	8,56	0,13	5,12	0,57	2,70	0,47	2,77	0,65
0,50	5,08	0,75	6,02	0,83	10,96	0,36	7,93	0,55	6,03	0,38	5,91	0,65
0,75	9,89	1,75	9,40	0,72	14,21	0,61	11,60	0,88	8,89	0,63	8,42	1,19
1	15,63	0,50	14,25	1,35	17,88	0,57	13,75	0,63	13,72	1,17	12,93	1,88
2	29,15	0,56	26,16	2,40	25,08	0,69	19,17	2,58	26,24	3,26	25,55	3,63
4	46,43	2,88	47,18	4,72	35,95	2,08	31,57	2,14	48,64	0,90	47,69	1,54

Fonte: a autora.

A Figura 36 e as tabelas 25 e 26 mostram a liberação de CPO a partir dos termogéis de Poloxamer e Micolamina®, através de membranas de silicone e PTFE. As formulações continham 16% de fármaco com exceção de Micolamina® e GP1 que continham 8% de CPO. A porcentagem de CPO liberada de Micolamina® foi relativamente semelhante em ambas as membranas, com cerca de 21% de liberação, que foi maior e estatisticamente significativa do que todas as formulações desenvolvidas.

O percentual total da dose aplicada de CPO liberada a partir das formulações contendo Poloxamer foi inferior a 5%, independentemente da membrana utilizada. Diferenças significativas foram encontradas em 4 horas de liberação percentual de CPO entre GP3 e outras formulações de termogel através de membranas de silicone e PTFE. Dentre as demais formulações, a GP1, apesar de conter 8% de CPO, apresentou maior liberação percentual e estatisticamente diferente da GP2, GP4 e GP5, através da membrana de PTFE.

Figura 36 - Média ($\pm$ DP, n=6) da liberação percentual cumulativa de CPO durante testes de IVRT realizados com formulações de termogéis GP1-GP5 e Micolamina®. Os termogéis GP2-GP5 foram carregados com 16% da droga, enquanto Micolamina® e GP1 continham 8% de CPO. Efeito significativo ($p < 0,05$) para a quantidade total liberada entre diferentes membranas (*) (ANOVA one-way, post-hoc Bonferroni). Painel direito: Os dados correspondentes a GP1 e GP2 foram deslocados 0,1h para a direita para melhorar a visibilidade. Painel esquerdo: os dados correspondentes ao GP2 foram ajustados em 0,1h e GP4 foi ajustado em 0,2h para melhorar a visibilidade.



Fonte: a autora.

Tabela 25 - Liberação cumulativa de CPO (média $\pm$ DP; n = 6) através de membranas de silicone expressas como porcentagem da dose aplicada de termogéis de 8% (GP1) e 18% (GP2-GP5) e Micolamina®.

Tempo (h)	FORMULAÇÕES DE CPO											
	Cumulativo (%)											
	Micolamina®		GP1		GP2		GP3		GP4		GP5	
	Média	DP	Média	DP	Média	DP	Média	DP	Média	DP	Média	DP
0,08	1,07	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
0,16	2,10	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
0,33	5,34	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
0,50	8,80	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
0,75	12,66	0	0	0	0	0	1,58	0	0	0	0	0
1	16,80	0,04	0	0	0	0	1,84	0	0	0	0	0
2	19,94	0,08	1,53	0,16	0,94	0,04	2,38	0,04	1,25	0,04	0,42	0,03
4	22,15	0,74	2,18	0,25	1,39	0,14	3,43	0,08	1,91	0,16	0,92	0,02

Fonte: a autora.

Tabela 26 - Liberação cumulativa de CPO (média $\pm$ DP; n = 6) através de membranas de PTFE expressa como porcentagem da dose aplicada de termogéis de 8% (GP1) e 18% (GP2-GP5) e Micolamina®.

Tempo (h)	FORMULAÇÕES DE CPO											
	Cumulativo (%)											
	Micolamina®		GP1		GP2		GP3		GP4		GP5	
	Média	DP	Média	DP	Média	DP	Média	DP	Média	DP	Média	DP
0,08	1,62	0,50	1,35	0,08	0,63	0,01	0,64	0,01	0,21	0,01	0,43	0,09
0,16	2,02	0,26	1,46	0,07	0,70	0,02	0,70	0,03	0,23	0,01	0,43	0,12
0,33	3,33	0,42	1,61	0,08	0,76	0,02	0,76	0,02	0,25	0,01	0,56	0,14
0,50	4,38	0,91	1,74	0,07	0,84	0,02	0,82	0,04	0,27	0,01	0,59	0,14
0,75	5,95	1,12	1,91	0,13	0,89	0,01	1,04	0,25	0,34	0,07	0,63	0,15
1	7,62	1,71	2,10	0,25	0,96	0,02	2,83	0,50	0,92	0,14	0,91	0,10
2	12,19	1,71	2,40	0,35	1,03	0,04	4,26	0,38	1,39	0,08	1,15	0,28
4	20,56	1,51	2,86	0,13	1,59	0,08	4,86	0,25	1,59	0,15	1,60	0,05

Fonte: a autora.

Embora a liberação de CPO da formulação de gel seja dependente da membrana usada para o teste, esse não foi o caso das formulações de termogel e a liberação de CPO em ambas as membranas foi relativamente semelhante. Uma comparação dos dados de IVRT-silicone não sugeriria grandes diferenças entre os produtos de gel e termogel, no entanto, os dados de IVRT-PTFE permitiram encontrar diferenças entre os produtos de gel e termogel, onde o primeiro liberou o fármaco com mais eficiência. Isso destaca a importância da escolha da membrana nos estudos de IVRT para fins de qualidade e como parte de um conjunto de ensaio para bioequivalência desses produtos.

5.7 AVALIAÇÃO DA PERMEACÃO *EX VIVO* E RETENÇÃO UNGUEAL DO CICLOPIROX OLAMINA

Em virtude de todas as discussões relacionadas ao uso dos cascos bovinos no IVPT como predição para a permeação ungueal humana, e a semelhança limitada entre elas, devido a maior permeabilidade dos cascos bovinos (CUTRÍN-GÓMEZ *et al.*, 2018a; TÄUBER; MÜLLER-GOYMANN, 2015), optamos neste estudo pelo uso de unhas humanas doadas por voluntários sadios, apesar da dificuldade de sua obtenção, principalmente em um momento como o da pandemia do COVID-19. Para tanto, um aditivo ao CEP-UFPE visando fornecer mais segurança para a equipe da pesquisa foi necessário.

A primeira série de experimentos comparou dois arranjos de IVPT envolvendo doses múltiplas em unhas não poradas (MD-NP) ou uma dose única em unhas microporadas (SD-MP) e 3 formulações contendo 8% de CPO, incluindo o esmalte referência.

A Tabela 27 e a Figura 37 mostram a quantidade de CPO retida nas unhas (CPO-unha) e analisada no líquido receptor (CPO-LR) após 14 dias, com aplicação diária de uma dose de 10 µl em unhas não poradas (MD- NP), e aplicação de uma dose única de 50 µL nas unhas microporadas (SD-MP). O último teste foi feito após lixamento e microporação com agulhas de titânio comercialmente disponíveis no lado dorsal da unha. Independentemente do tipo de experimento, foi observado uma permeação e retenção de CPO menor, cerca de metade, para a Micolamina® em comparação com as formulações testes GH1 e GP1.

No experimento MD-NP nenhum fármaco foi encontrado no líquido receptor após 7 ou 14 dias para as formulações testadas e a quantidade de CPO encontrada fora das áreas de difusão da unha (possível difusão lateral) foi inferior a 5% da quantidade encontrada na área de permeação. Já no experimento SD-MP, CPO foi encontrada apenas nas amostras de líquido receptor após 14 dias, e a difusão lateral do fármaco foi de 1,5 a 11% do fármaco encontrado

na área de permeação ungueal. Vale salientar que neste estudo as dimensões de cada unha utilizada no processo de permeação não foram padronizadas. Ressaltamos, portanto, a importância da realização deste procedimento em estudos subsequentes.

A ocorrência de difusão lateral foi relatada na literatura por Palliyil *et al.* (2014), utilizando formulações de CPO. O pesquisador também fez uso de um corante solúvel em água, sal de sódio vermelho de metila, para visualizar o processo de difusão lateral usando um novo experimento de unha suspensa.

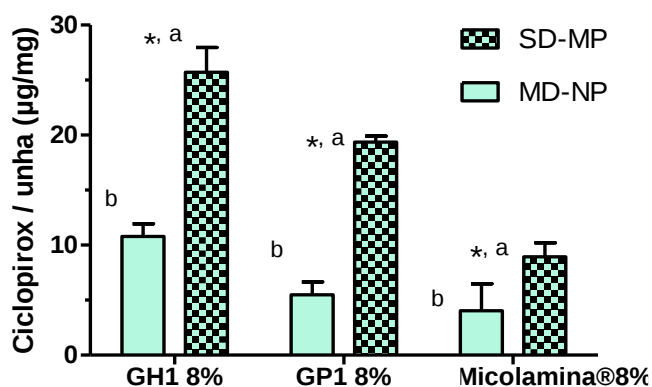
Outro ponto importante de ser destacado é o que de fato seria uma difusão lateral, ou a migração da formulação através do adaptador de unhas. De acordo com Monti *et al.*, (2011), tanto as unhas saudáveis quanto as doentes são muito difíceis de manusear; o aparato de permeação deve ser pequeno o suficiente para mantê-las seguras, e muito resistentes pois as unhas são curvas e devem ser fixadas sob alta pressão no momento do fechamento dos adaptadores. Vale a pena mencionar que no estudo de Monti *et al.* (2011), foi utilizado um aparato utilizando frasco de vidro com uma tampa perfurada.

Tabela 27 - Quantidade (média $\pm$ DP, n=4) de CPO analisada no líquido receptor (CPO-LR) e extraída da unha (CPO-unha) após a série MD-NP (aplicação diária de 10 μ L) e SD-MP (aplicação única 50 μ L). Todas as formulações continham 8% de CPO.

FORMULAÇÃO	MD-NP		SD-MP	
	CPO-unha (μ g/mg)	CPO-LR (μ g/cm ²)	CPO-unha (μ g/mg)	CPO-LR (μ g/cm ²)
GH1	12,47	0,00	28,79	3,32
GH1	10,64	0,00	24,81	3,57
GH1	9,91	0,00	25,74	4,59
GH1	10,11	0,00	23,55	3,83
GH1 (Média $\pm$ DP)	10,78 $\pm$ 1,17	0	25,72 $\pm$ 2,23	3,83 $\pm$ 0,55
GH1 (CV%)	10,82	NA	8,68	14,60
GP1	5,3	0,00	19,42	4,08
GP1	4,15	0,00	19,26	3,57
GP1	5,44	0,00	18,76	3,32
GP1	7,04	0,00	20,05	3,32
GP1 (Média $\pm$ DP)	5,48 $\pm$ 1,19	0	19,37 $\pm$ 0,53	3,57 $\pm$ 0,36
GP1 (CV%)	21,68	NA	2,75	10,10
Micolamina®	2,77	0,00	10,14	2,04
Micolamina®	2,77	0,00	8,85	1,02
Micolamina®	2,95	0,00	7,16	1,28
Micolamina®	2,70	0,00	9,57	1,28
Micolamina® (Média $\pm$ DP)	2,80 $\pm$ 0,11	0	8,93 $\pm$ 1,29	1,40 $\pm$ 0,44
Micolamina® (CV%)	3,82	NA	14,48	31,49

Fonte: a autora.

Figura 37 - Quantidade de CPO (média $\pm$ DP, n=4) recuperada da unha (CPO-unha) após experimentos MD-NP e SD-MP conduzidos com formulações de gel (GH1 8%), termogel (GP1 8%) e Micolamina® esmalte. Efeito significativo ($p < 0,0001$) da poração (*); significativamente ($0,0001$) diferente de todas as outras formulações nas condições SD-MP (a) e MD-NP (b).

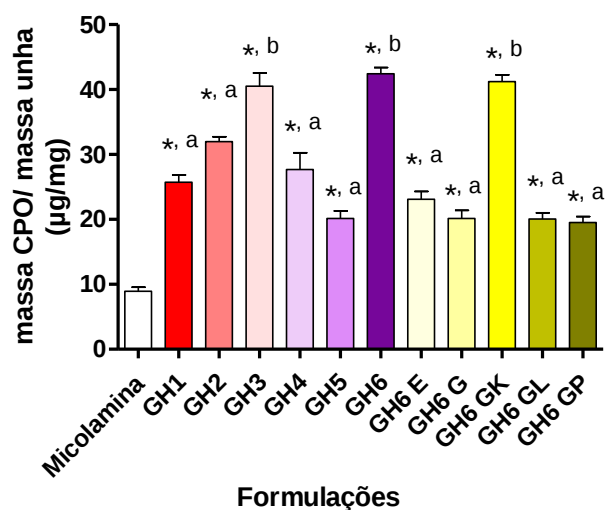


Fonte: a autora.

Mesmo não havendo passagem do CPO através da lâmina ungueal, as formulações GH1 e GP1 apresentaram retenção significativamente diferente e maior que Micolamina® (ANOVA com nível de significância estatística fixado em $p < 0,05$). De acordo com o teste *T-student*, a retenção de CPO a partir da formulação GH1 foi significativamente maior que GP1 ($p < 0,05$). Fato este justificado, possivelmente, pela presença da ureia e KOH e 0,5% do HPMC na formulação GH1 comparado com 20% do poloxamer e ausência dos dois excipientes citados acima na formulação GP1. Dados similares haviam sido obtidos por Thapa *et al.*, (2016) utilizando formulação ungueal contendo praticamente os mesmos constituintes (8% CPO, 0,5% hidroxipropil celulose - HPC, 1% ureia, 2,5% KOH, 12,4% H₂O e 75,6% de isopropanol) da formulação GH1 deste trabalho.

Esses resultados sugeriram que a combinação da microporação ungueal com uma única dose do produto, favorece a permeação do fármaco de forma mais eficiente do que múltiplas doses diárias aplicadas em unhas não poradas. Diante do acima exposto, as outras formulações de GH e GP foram avaliadas apenas em experimentos com o arranjo SD-MP (Figura 38, Tabela 28).

Figura 38 - Quantidade de CPO (média $\pm$ DP, n=4) recuperada da unha (CPO-unha), após experimentos SD-MP de 14 dias de duração conduzidos com formulações de gel de HPMC. Retenção significativa ($p < 0,05$) em comparação com Micolamina® (*). A mesma letra indica grupos homogêneos (ANOVA one-way, post-hoc de Bonferroni, $\alpha < 0,05$).



Fonte: a autora.

Tabela 28 - CPO extraído da unha (CPO-unha) seguindo experimentos SD-MP. Dados individuais de cada experimento são mostrados. Dados expressos em massa de fármaco/massa de unha.

Formulação (CPO%)	CPO-unha (µg/mg)				Média $\pm$ DP
Micolamina® 8%	10,14	8,85	7,16	9,57	8,93 $\pm$ 1,29
GH1 (8%)	28,79	24,81	25,74	23,55	25,72 $\pm$ 2,23
GH2 (16%)	31,33	34,00	30,47	32,09	31,97 $\pm$ 1,50
GH3 (16%)	42,09	35,96	45,41	38,63	40,52 $\pm$ 4,11
GH4 (16%)	30,41	30,88	29,53	29,00	29,96 $\pm$ 0,85
GH5 (8%)	16,71	22,17	20,64	21,00	20,13 $\pm$ 2,37
GH6 (16%)	42,62	45,14	40,96	40,96	42,42 $\pm$ 1,97
GH6-E (16%)	21,41	24,06	20,81	26,09	23,09 $\pm$ 2,45
GH6-G (16%)	19,63	17,16	23,09	20,73	20,15 $\pm$ 2,46
GH6-GK (16%)	39,10	43,87	41,93	40,00	41,23 $\pm$ 2,12
GH6-GL (16%)	19,18	18,29	22,75	20,01	20,06 $\pm$ 1,93
GH6-GP (16%)	20,63	17,52	18,63	21,36	19,54 $\pm$ 1,77

Fonte: a autora.

A Figura 38 mostra os resultados de SD-MP conduzidos com formulações de gel HPMC e com Micolamina®. A quantidade de CPO recuperada da unha (CPO-unha) foi (a) maior quando transcutool ou propilenoglicol foram incluídos na composição da formulação, (b) maior quando a concentração de CPO foi aumentada associada ao transcutool na formulação, (c) menor quando o KOH foi diminuído ou a viscosidade da formulação foi aumentada, (d) sem alteração com a adição de acetato de etila e (e) menor para Micolamina® em comparação com todas as formulações desenvolvidas. Trabalhos anteriores realizados por Thapa *et al.* (2016), relataram maior retenção ungueal de CPO para formulações contendo hidróxido de potássio 2,5% como agente alcalinizante, quando comparadas com formulações comercializadas utilizando unhas humanas.

A comparação entre GH6 e GH6-GK indica que a inclusão de acetato de etila não teve efeito significativo na retenção de CPO nas unhas. Por fim, a inclusão de outros tensoativos e ceras nos veículos GH6-GL e GH6-GP levou a uma diminuição da quantidade de CPO retida da unha, talvez devido ao aumento da viscosidade do veículo. Nenhuma correlação foi observada entre os estudos de IVPT e IVRT.

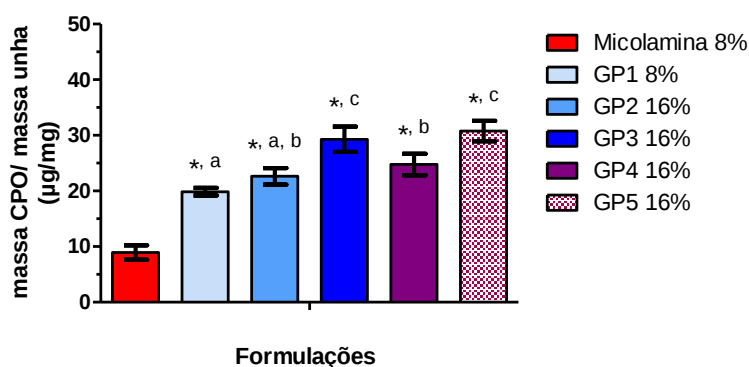
A Figura 39 e a Tabela 29 mostram os resultados de IVPT obtidos com as formulações em termogel. Um teste ANOVA one-way post-hoc Bonferroni ($p < 0,05$), indicou que CPO extraído da unha (CPO-unha) foi significativamente maior ($p < 0,05$), para as formulações de GP do que para Micolamina® (Figura 39).

A quantidade de CPO recuperada da unha (CPO-unha) foi (a) sem alteração com o aumento da concentração de CPO, transcutool ou adição de LSS na formulação, (b) maior quando a concentração de CPO foi aumentada associada à adição de KOH/ureia na formulação.

Finalmente, as comparações entre os dois veículos com melhor desempenho de cada polímero, GH6 e GP5, indicaram que a formulação gel (HPMC) resultou em uma retenção de CPO significativamente mais alta ($p < 0,05$, teste t-Student): $42,42 \pm 1,97 \mu\text{g.cm}^{-2}$ versus $30,78 \pm 1,83 \mu\text{g.cm}^{-2}$ para o gel e veículo termogel, respectivamente.

Potencialmente, a maior viscosidade do GP5, preparado com 20% de Poloxamer®, poderia, em parte, explicar este resultado. No entanto, diferentes publicações mostram que o uso deste polímero em sistema de polipseudorotaxano solúvel em poloxamer/ciclodextrina melhoraram a permeação de CPO através das unhas (CUTRÍN-GÓMEZ *et al.*, 2018b, a; CUTRÍN-GÓMEZ *et al.*, 2020; NOGUEIRAS-NIETO, LUIS; BEGOÑA DELGADO-CHARRO; OTERO-ESPINAR, 2013). Nenhuma correlação foi observada entre os resultados de IVPT e IVRT.

Figura 39 - Quantidade de CPO (média $\pm$ DP, n=4) recuperada da unha (CPO-unha) após a série SD-MP realizados com formulações de termogel e Micolamina®. Os termogéis GP2-GP5 foram carregados com 16% da droga, enquanto Micolamina® e GP1 continham 8% de CPO. Retenção significativa ($p < 0,05$) em comparação com Micolamina® (*). A mesma letra indica grupos homogêneos (ANOVA one-way, post-hoc de Bonferroni, $\alpha < 0,05$).



Fonte: a autora.

Tabela 29 - CPO extraído da unha (CPO-unha) seguindo experimentos SD-MP realizados com formulações de termogel (GP) e Micolamina®. Dados individuais de cada experimento são mostrados. Dados expressos em massa de fármaco/massa de unha.

Formulação	CPO-unha (µg/mg)				Média $\pm$ DP
Micolamina® 8%	10,14	8,85	7,16	9,57	8,93 $\pm$ 1,29
GP1 8%	19,42	19,26	20,76	20,05	19,87 $\pm$ 0,68
GP2 16%	22,20	23,52	24,05	20,73	22,62 $\pm$ 1,48
GP3 16%	30,16	26,49	31,83	28,63	29,28 $\pm$ 2,27
GP4 16%	27,11	25,09	22,46	24,36	24,75 $\pm$ 1,92
GP5 16%	30,16	28,51	31,83	32,63	30,78 $\pm$ 1,83

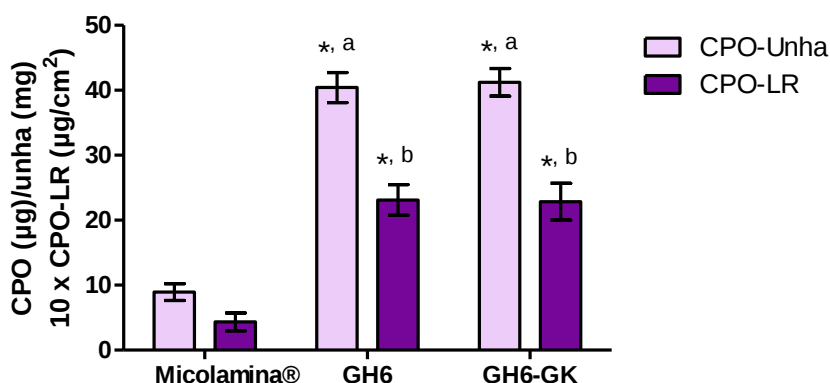
Fonte: a autora.

A Figura 40 e tabela 30 mostram os resultados de IVPT obtidos a partir das formulações selecionadas (GH6 e GH6-GK) para avaliação microbiológica comparativa com Micolamina®. A quantidade de CPO extraída da unha (CPO-unha) bem como a quantidade permeada para o líquido receptor (CPO-LR) foram três vezes maiores para essas formulações de gel em relação à Micolamina®. Nenhum CPO foi detectado no receptor após 7 dias de permeação em qualquer caso. Após 14 dias, CPO-LR (média $\pm$ DP, n=4) foi de $4,36 \pm 1,38 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ para Micolamina®, $23,12 \pm 2,34 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ para GH6 e $22,86 \pm 2,84 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ para GH6-GK. O CPO permeado foi menor ($p < 0,05$) para Micolamina®, em comparação com as formulações desenvolvidas. CPO-unha (média $\pm$ DP, n=4) foi de $8,93 \pm 1,29 \mu\text{g}/\text{mg}$ para Micolamina®, $40,42 \pm 2,32 \mu\text{g}/\text{mg}$ para

GH6 e $41,22 \pm 2,12$ $\mu\text{g}/\text{mg}$ para GH6-GK. O CPO na unha foi menor ($p < 0,05$) para Micolamina®, em comparação com as formulações desenvolvidas (ANOVA one-way, post-hoc de Bonferroni, $\alpha < 0,05$).

Na tentativa de estimar o aparecimento de cristais do CPO após exposição das formulações (Micolamina®, GH6 e GH6-GK) em lâminas de vidro, mantidas a uma temperatura de $32 \pm 1^\circ\text{C}$, apesar da maior quantidade de fármaco (16%) presente em GH6 e GH6-GK, não foi observada precipitação por até 4 horas pós-aplicação. Para Micolamina®, foi observada a formação de um filme duro, brilhante, resistente e incolor, mas também não foram visualizadas a presença de cristais.

Figura 40 – CPO recuperado da unha (CPO-unha) e permeado para o líquido receptor (CPO-LR) após 14 dias do experimento SD-MP realizados com GH6, GH6-GK e esmalte Micolamina® (média $\pm$ DP, $n = 4$). As formulações de gel GH6 e GH6-GK continham 16% de CPO, Micolamina® continha 8% de CPO. Retenção significativa ($p < 0,05$) em comparação com Micolamina® (*). A mesma letra indica grupos homogêneos (ANOVA two-way, post-hoc de Bonferroni, $\alpha < 0,05$).



Fonte: a autora.

Tabela 30 – CPO-unha e CPO-LR obtidos após experimentos SD-MP com GH6, GH6-GK e Micolamina® (média $\pm$ DP, $n = 4$).

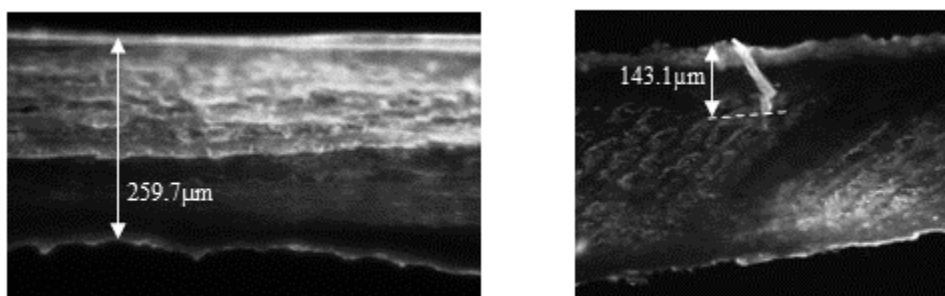
Formulação	CPO-unha ($\mu\text{g}/\text{mg}$)				Média $\pm$ DP	CPO-LR ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$)				Média $\pm$ DP
Micolamina®	10,14	8,85	7,16	9,57	$8,93 \pm 1,29$	6,35	3,17	3,97	3,97	$4,36 \pm 1,38$
GH6	42,62	37,14	40,96	40,96	$40,42 \pm 2,32$	24,38	21,80	25,71	20,58	$23,12 \pm 2,34$
GH6-GK	39,10	43,87	41,93	40,00	$41,22 \pm 2,12$	22,48	26,29	23,29	19,39	$22,86 \pm 2,84$

Fonte: a autora.

5.7.1 Avaliação microscópica das amostras de unha humana

A figura abaixo mostra um corte transversal representativo de uma unha que foi hidratada e lixada apenas (Figura 41a) e de uma unha após hidratação, lixamento e microporação (Figura 41b). Quando os poros foram encontrados, sua profundidade foi sempre menor que a espessura total da placa. Como exemplo, na microscopia mostrada na Figura 41 a espessura total da unha foi de $259,7\ \mu\text{m}$ e a profundidade dos poros foi de $143,1\ \mu\text{m}$, demonstrando que o procedimento de microporação não criou canais que ultrapassem a espessura total da unha.

Figura 41 – Avaliação microscópica da unha não porada (NP) (a) e da unha microporada (MP) (b).



(a) Unha não porada (NP)

(b) Unha microporada (MP)

Corroborando nossas observações, de acordo com Chiu *et al.* (2015), embora seja improvável que uma matriz de microagulhas possa penetrar completamente através da unha, podem ser criadas fissuras nas quais formulações podem ser depositadas. No estudo acima citado, foi utilizado o Dermalroller, aparato diferente deste utilizado no nosso estudo que foi o Hydra.needle™.

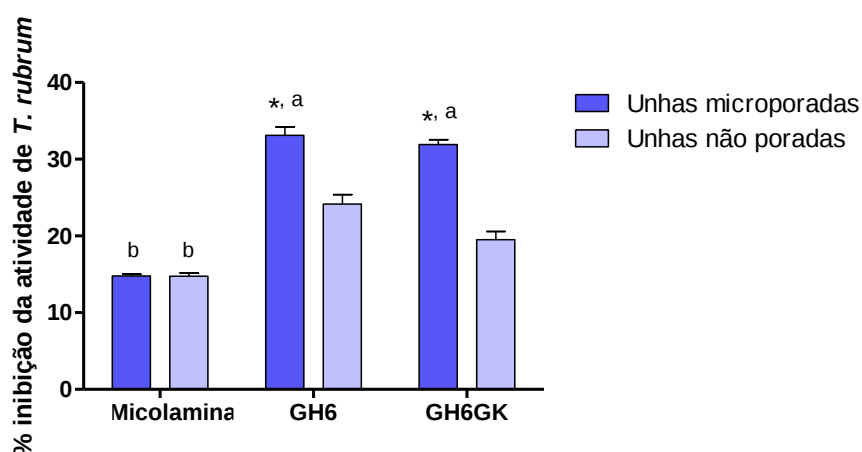
5.8 AVALIAÇÃO ANTIFÚNGICA *IN VITRO* DAS FORMULAÇÕES

O método proposto por Sleven *et al.* (2015) e adaptado, foi barato e rápido e, portanto, uma ferramenta útil para comparar formulações antifúngicas. Os resultados são mostrados na Figura 42 e na Tabela 31. Com base em uma ANOVA two-way post-hoc Bonferroni ($p < 0,05$), a porcentagem de inibição da atividade de *T. rubrum* observada com unhas microporadas para formulações de gel foi estatisticamente significativamente maior do que o determinado para unhas não poradas. No entanto, a microporação não modificou o efeito inibitório causado pela Micolamina® (ANOVA one-way, post-hoc Bonferroni, $p < 0,05$). Os resultados do teste de

microbiologia foram, portanto, consistentes com os resultados do IVPT (Tabela 27) e demonstraram o potencial da microporação para melhorar as terapias antifúngicas ungueais. Em trabalho anterior (FLORES *et al.*, 2018), o impacto da microporação na liberação de tioconazol foi muito menor do que observado aqui para CPO, embora tenham sido testadas diferentes formulações e dispositivo de microporação. Segundo Flores *et al.* (2018), o dispositivo de microporação com rolo utilizado, produziu trincas longitudinais limitadas em profundidade e sugeriam que um ângulo mais perpendicular entre agulha e unha seria preferível para porções mais profundas. Isso é consistente com os resultados aqui relatados e indica a importância do desenvolvimento de dispositivos de microporação específicos para aplicações em unhas.

Por fim, os resultados corroboram a necessidade do desenvolvimento de formulações específicas para aplicação em unhas microporadas. Hipoteticamente, é possível que as formulações de gel fluam melhor pelos poros criados do que o esmalte e, portanto, disponibilizem mais fármaco no local desejado. Finalmente, a segurança do procedimento de microporação e sua eficácia em aplicações clínicas precisam ser avaliadas.

Figura 42 - Média ($\pm$ DP, n=4) do percentual de inibição da atividade de *T. rubrum* após IVPTs com géis (GH6 e GH6 GK 16%) e formulações de Micolamina® de unhas com e sem poros. Efeito significativo ($p < 0,05$) da poração (*). A mesma letra indica grupos homogêneos.



Fonte: a autora.

Tabela 31- Porcentagem de inibição da atividade de *T. rubrum* observada com formulações de gel e com Micolamina® usando unhas não porodas e microporadas.

Replicata	GH6		GH6-GK		Micolamina®	
	Não porada	Microporada	Não porada	Microporada	Não porada	Microporada
1	26,92	30,77	20,51	30,26	14,10	15,13
2	25,38	33,33	22,05	32,05	14,87	14,87
3	22,82	35,90	17,44	33,33	14,10	14,10
4	21,45	32,45	18,02	32,00	15,93	15,00
Média ±	24,14 ±	33,11 ±	19,51 ±	31,91 ±	14,75 ±	14,78 ±
DP	2,47	2,14	2,16	1,26	0,87	0,46

Fonte: a autora.

A Micolamina® foi utilizada para fins de comparação neste trabalho. Conforme a bula deste produto (THERASKIN®, 2020), foram realizados cinco estudos clínicos que avaliaram sua eficácia, seja por cura micológica, aumento da área ungueal não afetada ou redução da área afetada da unha. No entanto, para comparação direta com os nossos resultados, dados de IVRT, IVPT e avaliação microbiológica *in vitro* do produto de referência comercializado no Brasil não foram encontrados. Diante disto, os resultados semelhante ou superior de algumas das formulações aqui desenvolvidas comparadas com a Micolamina® são bastante encorajadores e justificam pesquisas adicionais.

6 CONCLUSÃO

- Com base na revisão sistemática realizada, foi possível evidenciar que todas as formulações desenvolvidas descritas nos artigos, apresentam maior retenção na unha e/ou permeiam através da unha em maior quantidade quando comparado com a formulação referência, respondendo de forma positiva à pergunta norteadora proposta inicialmente na revisão.

- Após a investigação da solubilidade do CPO em diversos solventes, algumas misturas binárias e terciárias foram selecionadas, a fim de formular preparações geleificadas contendo água, uma vez que a lâmina ungueal é de natureza hidrofílica, utilizando os polímeros HPMC e Poloxamer®. Além disso, também com base na solubilidade, foi possível incorporar nas formulações teste 16% de CPO, o dobro da concentração encontrada nas formulações comerciais e nos produtos desenvolvidos descrito na literatura consultada.

- O método analítico direto (sem a necessidade de derivatização) desenvolvido para quantificação do fármaco por cromatografia líquida de alta eficiência se mostrou adequado e capaz de produzir resultados confiáveis.

- A avaliação da morfologia da unha diante de diferentes processos de tratamento foi avaliada com auxílio de microscópio óptico, que de forma simples mostrou a uniformidade da superfície da lâmina ungueal após lixamento e a formação de fissuras sem perfuração após a microporação com microagulhas.

- Por fim, as novas formulações propostas (carregadas com 8 ou 16% de CPO) liberam o fármaco de forma mais eficiente do que o esmalte comercial (Micolamina®) através de unhas humanas microporadas e não poradas. O método físico (microporação com Hydra.needle™) utilizado neste estudo foi simples e melhorou o desempenho das formulações tanto nos estudos de permeação quanto no teste microbiológico. É necessário realizar mais pesquisas sobre essas formulações e abordagens de aprimoramento.

REFERÊNCIAS

- ACHTEN, G.; ANDRE, J.; LAPORTE, M. Nails in light and electron microscopy. *Seminars in Dermatology*, v. 10, n. 1, p. 54–64, 1 mar. 1991. Disponível em: <<https://europepmc.org/article/med/2018720>>. Acesso em: 3 maio 2021.
- ALUJA JARAMILLO, Felipe *et al.* Nail unit ultrasound: a complete guide of the nail diseases. *Journal of Ultrasound*, v. 20, n. 3, p. 181–192, 1 set. 2017. Acesso em: 12 maio 2021.
- AMEEN, M. *et al.* British Association of Dermatologists' guidelines for the management of onychomycosis 2014. *British Journal of Dermatology*, v. 171, n. 5, p. 937–958, 19 nov. 2014. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/bjd.13358>>. Acesso em: 2 maio 2021.
- ANAISSE, Elias. Opportunistic Mycoses in the Immunocompromised Host: Experience at a Cancer Center and Review. *Clinical Infectious Diseases*, v. 14, n. Supplement_1, p. S43–S53, 1 mar. 1992. Disponível em: <http://academic.oup.com/cid/article/14/Supplement_1/S43/365989/Opportunistic-Mycoses-in-the-Immunocompromised>. Acesso em: 19 abr. 2021.
- ANDREAS BOKER, MD. A randomized, double-blind, placebo-controlled, pilot study of 1% terbinafine cream applied twice daily and delivered via nail plate microporation for the treatment of subungual toenail onychomycosis. *J AM ACAD DERMATOL*, 2007.
- ARENAS, Roberto. Micología médica ilustrada. p. undefined-417, 2011.
- ARRESE, Jorge E.; PIÉRARD-FRANCHIMONT, Claudine; PIÉRARD, Gérald E. Facing up to the diagnostic uncertainty and management of onychomycoses. *International Journal of Dermatology*, v. 38, n. SUPPL. 2, p. 1–6, 1999. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10515522/>>. Acesso em: 2 maio 2021.
- AUVINEN, T. *et al.* Efficacy of topical resin lacquer, amorolfine and oral terbinafine for treating toenail onychomycosis: A prospective, randomized, controlled, investigator-blinded, parallel-group clinical trial. *British Journal of Dermatology*, v. 173, n. 4, p. 940–948, 1 out. 2015. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26036329/>>. Acesso em: 10 maio 2021.
- BADEN, H. P.; KUBILUS, J. Fibrous proteins of bovine hoof. *Journal of Investigative Dermatology*, v. 81, n. 3, p. 220–224, 1983. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/6411826/>>. Acesso em: 5 maio 2021.

BERG, F G. De la structure anatomico-pathologique du muguet (lettre à M. Gruby). *Ann Anat Physiol Pathol*, 1846.

BHUPTANI, Ronak S.; DESHPANDE, Ketaki M.; PATRAVALE, Vandana B. Transungual permeation: current insights. *Drug Delivery and Translational Research*, v. 6, n. 4, p. 426–439, 1 ago. 2016. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26419676/>>. Acesso em: 22 maio 2021.

BICKERS, David R. *et al.* The burden of skin diseases: 2004. A joint project of the American Academy of Dermatology Association and the Society for Investigative Dermatology. *Journal of the American Academy of Dermatology*, v. 55, n. 3, p. 490–500, set. 2006. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16908356/>>. Acesso em: 10 maio 2021.

BOHN, Manfred; KRAEMER, Karl Th. Dermatopharmacology of ciclopirox nail lacquer topical solution 8% in the treatment of onychomycosis. *Journal of the American Academy of Dermatology*, v. 43, n. 4 SUPPL., p. S57–S69, 1 out. 2000. Acesso em: 23 abr. 2021.

BRILHANTE, Rsn *et al.* Onychomycosis in Ceará (Northeast Brazil): epidemiological and laboratory aspects. *Mem Inst Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro*, v. 100, n. 2, p. 131–135, 2005. Acesso em: 11 maio 2021.

BRISTOW, Ivan; BARAN, Robert; SCORE, Michelle. Rapid Treatment of Subungual Onychomycosis Using Controlled Micro Nail Penetration and Terbinafine Solution. 2016. Acesso em: 15 maio 2021.

BRISTOW, Ivan R. The effectiveness of lasers in the treatment of onychomycosis: A systematic review. *Journal of Foot and Ankle Research*, v. 7, n. 1, p. 34, 27 jul. 2014. Acesso em: 15 maio 2021.

BROWN, M. B. *et al.* Overcoming the nail barrier: A systematic investigation of ungual chemical penetration enhancement. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 370, n. 1–2, p. 61–67, 31 mar. 2009. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19071202/>>. Acesso em: 4 maio 2021.

BU, Wei *et al.* A direct LC/MS/MS method for the determination of ciclopirox penetration across human nail plate in in vitro penetration studies. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, v. 51, n. 1, p. 230–235, 5 jan. 2010.

[BULA] FLUCOCIN® (fluconazol) EMS S/A Cápsula dura 150 mg. . [S.l: s.n.], [S.d.].

C RAMASWAMY *et al.* Iontophoresis to enhance topical delivery of terbinafine to the nail. *AAPS Conference*, 2007.

CASERINI, M. *Study to evaluate the efficacy and Safety of P-3058 Nail Solution in the Treatment of Onychomycosis*. Disponível em: <<https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT03094468>>. Acesso em: 28 abr. 2021.

CAVALCANTI, Isabelle M.F.S.D. *et al.* Topical Bioequivalence: Evaluation of Hydrocortisone Acetate, Betamethasone Valerate and Mupirocin Marketed Brazilian Products. *Latin American Journal of Pharmacy*, v. 38, p. 1122–1129, 2019.

CHACON, Anna *et al.* Psychosocial impact of onychomycosis: A review. *International Journal of Dermatology*, v. 52, n. 11, p. 1300–1307, nov. 2013. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24164152/>>. Acesso em: 17 maio 2021.

CHADEGANIPOUR, Mostafa; MOHAMMADI, Rasoul; SHADZI, Shahla. A 10-Year Study of Dermatophytoses in Isfahan, Iran. *Journal of Clinical Laboratory Analysis*, v. 30, n. 2, p. 103–107, 1 mar. 2016. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25902908/>>. Acesso em: 10 maio 2021.

CHI, Ching Chi; WANG, Shu Hui; CHOU, Ming Chih. The causative pathogens of onychomycosis in southern Taiwan. *Mycoses*, v. 48, n. 6, p. 413–420, nov. 2005. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16262878/>>. Acesso em: 28 abr. 2021.

CHIACCHIO, Nilton Di *et al.* An observational and descriptive study of the epidemiology of and therapeutic approach to onychomycosis in dermatology offices in Brazil * Estudo observacional descritivo da epidemiologia e abordagem terapêutica da onicomicose nos consultórios dermatológicos no Brasil. *An Bras Dermatol*, v. 88, n. 1Supl1, p. 1–12, 2013. Acesso em: 11 maio 2021.

CHIU, Wing Sin *et al.* Drug delivery into microneedle-porated nails from nanoparticle reservoirs. *Journal of Controlled Release*, v. 220, p. 98–106, 28 dez. 2015. Acesso em: 22 maio 2021.

CHOUHAN, P; SAINI, T. R. Development and validation of a HPLC method for direct estimation of ciclopirox olamine in ex-vivo transungual permeation studies. *Indian Drugs*, 2016a.

CHOUHAN, P.; SAINI, T. R. D-optimal design and development of microemulsion based transungual drug delivery formulation of ciclopirox olamine for treatment of onychomycosis. *Indian Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 78, n. 4, p. 498–511, 1 jul. 2016b.

CHOUHAN, P.; SAINI, T. R. Hydration of nail plate: A novel screening model for transungual drug permeation enhancers. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 436, n. 1–2, p. 179–182, 15 out. 2012. Acesso em: 28 abr. 2021.

CHRISTENSEN, Luisa *et al.* Evaluation of the ability of a novel miconazole formulation to penetrate nail by using three in vitro nail models. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 61, n. 7, 1 jul. 2017. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28438926/>>. Acesso em: 15 maio 2021.

CIOCON, David *et al.* How low should you go: Novel device for nail trephination. *Dermatologic Surgery*, v. 32, n. 6, p. 828–833, jun. 2006. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16792649/>>. Acesso em: 9 maio 2021.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (CLSI). *Método de Referência para Testes de Diluição em Caldo para Determinação da Sensibilidade de Leveduras à Terapia Antifúngica: Norma Aprovada*. 2^a ed. [S.l: s.n.], [S.d.].

CRAWFORD, Fay; HOLLIS, S. Topical treatments for fungal infections of the skin and nails of the foot. *Cochrane Database of Systematic Reviews*, v. 2007, n. 3, 2007. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17636672/>>. Acesso em: 10 maio 2021.

CUTRÍN GÓMEZ, Elena *et al.* Microstructural alterations in the onychomycotic and psoriatic nail: Relevance in drug delivery. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, v. 128, p. 48–56, 1 jul. 2018. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29673870/>>. Acesso em: 21 maio 2021.

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

CUTRÍN-GÓMEZ, Elena *et al.* Effect on nail structure and transungual permeability of the ethanol and poloxamer ratio from cyclodextrin-soluble polypseudorotaxanes based nail lacquer. *Pharmaceutics*, v. 10, n. 3, 11 set. 2018b.

CUTRÍN-GÓMEZ, Elena *et al.* Optimization of drug permeation from 8% ciclopirox cyclodextrin/poloxamer-soluble polypseudorotaxane-based nail lacquers. *Pharmaceutics*, v. 12, n. 3, 1 mar. 2020.

DA SILVA PONTES, Z. B.V. *et al.* Onychomycosis in João Pessoa city, Brazil. *Revista Argentina de Microbiologia*, v. 34, n. 2, p. 95–99, 1 abr. 2002. Disponível em: <<https://europepmc.org/article/med/12180263>>. Acesso em: 11 maio 2021.

DAVIES, R. R.; EVERALL, J. D.; HAMILTON, Elizabeth. Mycological and Clinical Evaluation of Griseofulvin for Chronic Onychomycosis. *British Medical Journal*, v. 3, n. 5563, p. 464–468, 19 ago. 1967. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20791323/>>. Acesso em: 3 maio 2021.

DE ARAÚJO, Adauto José Gonçalves *et al.* Onychomycosis caused by emergent fungi: Clinical analysis, diagnosis and revision. *Anais Brasileiros de Dermatologia*, v. 78, n. 4, p. 445–455, 2003. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0365-05962003000400006&lng=pt&nrm=iso&tlng=pt>. Acesso em: 2 maio 2021.

DE BERKER, David. *Nail anatomy. Clinics in Dermatology*. [S.l.: s.n.], set. 2013

DE BESARQUES, Jean. *Histoire visuelle de la dermatologie et de la mycologie l'art de regarder*. [S.l.]: Cilag Janssen, 1994.

DELGADO-CHARRO, Maria Begoña. Iontophoretic drug delivery across the nail. *Expert Opinion on Drug Delivery*, v. 9, n. 1, p. 91–103, jan. 2012. Acesso em: 10 maio 2021.

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

DITTMAR, W. *et al.* MIKROBIOLOGISCHE LABORUNTERSUCHUNGEN MIT CICLOPIROXOLAMIN. *Arzneimittel-Forschung/Drug Research*, v. 31, n. 8 a, p. 1317–1322, 1 jan. 1981. Disponível em: <<https://europepmc.org/article/med/7197538>>. Acesso em: 18 abr. 2021.

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

EENGLISH, Mary P. NAILS AND FUNGI. *British Journal of Dermatology*, v. 94, n. 6, p. 697–701, 1976. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/132961/>>. Acesso em: 16 maio 2021.

EINARSON, Thomas R. *et al.* Clinical and economic factors in the treatment of onychomycosis. *PharmacoEconomics*, v. 9, n. 4, p. 307–320, 1996. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10160105/>>. Acesso em: 10 maio 2021.

ELEWSKI, Boni E. *et al.* Efinaconazole 10% solution in the treatment of toenail onychomycosis: Two phase III multicenter, randomized, double-blind studies. *Journal of the American Academy of Dermatology*, v. 68, n. 4, p. 600–608, 1 abr. 2013. Acesso em: 3 maio 2021.

ELEWSKI, Boni E. Onychomycosis: Treatment, quality of life, and economic issues. *American Journal of Clinical Dermatology*, v. 1, n. 1, p. 19–26, 2000. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11702301/>>. Acesso em: 17 maio 2021.

ELEWSKI, Boni E.; TOSTI, Antonella. Tavaborole for the treatment of onychomycosis. *Expert Opinion on Pharmacotherapy*, v. 15, n. 10, p. 1439–1448, 2014. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24856836/>>. Acesso em: 10 maio 2021.

ELKEEB, Rania *et al.* Transungual drug delivery: Current status. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 384, n. 1–2, p. 1–8, 15 jan. 2010. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19819318/>>. Acesso em: 5 maio 2021.

ELLABIB, M. S. *et al.* Yeasts of the genus *Candida* are the dominant cause of onychomycosis in Libyan women but not men: Results of a 2-year surveillance study. *British Journal of Dermatology*, v. 146, n. 6, p. 1038–1041, 2002. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12072073/>>. Acesso em: 28 abr. 2021.

ELLIS, D. H. Diagnosis of onychomycosis made simple. *Journal of the American Academy of Dermatology*, v. 40, n. 6 II, p. S3, 1999. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10367909/>>. Acesso em: 2 maio 2021.

ELSAYED, Mustafa 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, 10 fev. 2015. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25481439/>>. Acesso em: 28 abr. 2021.

EL-SHERIF, Noha Ibrahim; SHAMMA, Rehab N.; ABDEL BARY, Ghada. In-situ gels and nail lacquers as potential delivery systems for treatment of onychomycosis. A comparative study. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, v. 43, p. 253–261, 1 fev. 2018. Acesso em: 20 maio 2021.

ENDRINGER PINTO, Fernanda *et al.* Visualisation of penetration of topical antifungal drug substances through mycosis-infected nails by matrix-assisted laser desorption ionisation mass spectrometry imaging. *Mycoses*, v. 63, n. 8, p. 869–875, 1 ago. 2020. Acesso em: 16 fev. 2022.

ESCARRONE, Ana Laura V. *et al.* LC-UV method with pre-column derivatization for the determination of ciclopirox olamine in raw material and topical solution. *Chromatographia*, v. 67, n. 11–12, p. 967–971, jun. 2008. Acesso em: 24 maio 2021.

FAERGEMANN, J.; BARAN, R. Epidemiology, clinical presentation and diagnosis of onychomycosis. *British Journal of Dermatology, Supplement*, v. 149, n. 65, p. 1–4, 2003. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/14510968/>>. Acesso em: 28 abr. 2021.

FARREN, L.; SHAYLER, S.; ENNOS, A. R. The fracture properties and mechanical design of human fingernails. *Journal of Experimental Biology*, v. 207, n. 5, p. 735–741, fev. 2004. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/14747405/>>. Acesso em: 12 maio 2021.

FDA. *Draft guidance for industry on topical dermatological drug product NDAs and ANDAs - In vivo bioavailability, bioequivalence, in vitro release, and associated studies*. Rockville: Food and Drug Administration. Center for Drug Evaluation and Research (CDER), 1998.

FINCH, Justin J.; WARSHAW, Erin M. Toenail onychomycosis: Current and future treatment options. *Dermatologic Therapy*, v. 20, n. 1, p. 31–46, jan. 2007. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17403258/>>. Acesso em: 28 abr. 2021.

FLORES, Fernanda C. *et al.* Enhancement of tioconazole ungual delivery: Combining nanocapsule formulation and nail poration approaches. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 535, n. 1–2, p. 237–244, 15 jan. 2018. Acesso em: 9 maio 2021.

GARCÍA-ROMERO, Maria T.; ARENAS, Roberto. New insights into genes, immunity, and the occurrence of dermatophytosis. *Journal of Investigative Dermatology*, v. 135, n. 3, p. 655–657, 12 mar. 2015. Acesso em: 28 abr. 2021.

GASPARINI, G. *et al.* The Effect of Ciclopiroxolamine Investigated by Means of the Freeze-Fracture Technique: Untersuchung der Wirkung von Ciclopiroxolamin mit der Freeze-Fracture-Technik. *Mycoses*, v. 29, n. 11, p. 539–544, 1986. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/3540664/>>. Acesso em: 23 abr. 2021.

GELOTAR, Prakash *et al.* The prevalence of fungi in fingernail onychomycosis. *Journal of Clinical and Diagnostic Research*, v. 7, n. 2, p. 250–252, 1 fev. 2013. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/2502285/>>. Acesso em: 2 maio 2021.

GHANNOUM, M. A. *et al.* Ability of hydroxypropyl Chitosan nail lacquer to protect against dermatophyte nail infection. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 59, n. 4, p. 1844–1848, 1 abr. 2015. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25547349/>>. Acesso em: 16 maio 2021.

GHANNOUM, Mahmoud *et al.* A pilot, layerwise, ex vivo evaluation of the antifungal efficacy of amorolfine 5% nail lacquer vs other topical antifungal nail formulations in healthy toenails. *Mycoses*, v. 62, n. 6, p. 494–501, 1 jun. 2019. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30667544/>>. Acesso em: 15 maio 2021.

GHANNOUM, Mahmoud; ISHAM, Nancy. Fungal Nail Infections (Onychomycosis): A Never-Ending Story? *PLoS Pathogens*, v. 10, n. 6, 2014. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24901242/>>. Acesso em: 10 maio 2021.

GÓMEZ, Elena Cutrín *et al.* Evaluation of the promoting effect of soluble cyclodextrins in drug nail penetration. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 117, p. 270–278, 30 maio 2018.

GREGORÍ VALDES, Barbara S. *et al.* New Polyurethane Nail Lacquers for the Delivery of Terbinafine: Formulation and Antifungal Activity Evaluation. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 106, n. 6, p. 1570–1577, 1 jun. 2017. Acesso em: 21 maio 2021.

GUNT, Hemali B.; KASTING, Gerald B. Effect of hydration on the permeation of ketoconazole through human nail plate in vitro. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 32, n. 4–5, p. 254–260, dez. 2007. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17928205/>>. Acesso em: 5 maio 2021.

GUPTA, A. K. Ciclopirox: an overview. *Int J Dermatol*, p. 305–310, 2001.

GUPTA, A. K.; VERSTEEG, S. G. A critical review of improvement rates for laser therapy used to treat toenail onychomycosis. *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology*, v. 31, n. 7, p. 1111–1118, 1 jul. 2017. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28294418/>>. Acesso em: 15 maio 2021.

GUPTA, Aditya K. *et al.* Epidemiology and prevalence of onychomycosis in HIV-positive individuals. *International Journal of Dermatology*, v. 39, n. 10, p. 746–753, out. 2000. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1046/j.1365-4362.2000.00012.x>>. Acesso em: 28 abr. 2021.

GUPTA, Aditya K. *et al.* Update on current approaches to diagnosis and treatment of onychomycosis. *Expert Review of Anti-Infective Therapy*, v. 16, n. 12, p. 929–938, 2 dez. 2018. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30411650/>>. Acesso em: 15 maio 2021.

GUPTA, Aditya K.; COOPER, Elizabeth A.; PAQUET, Maryse. Recurrences of dermatophyte toenail onychomycosis during long-term follow-up after successful treatments with mono- and combined therapy of terbinafine and itraconazole. *Journal of Cutaneous Medicine and Surgery*, v. 17, n. 3, p. 201–206, maio 2013. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23673304/>>. Acesso em: 16 maio 2021.

GUPTA, Aditya K.; FLECKMAN, Philip; BARAN, Robert. Ciclopirox nail lacquer topical solution 8% in the treatment of toenail onychomycosis. *Journal of the American Academy of Dermatology*, v. 43, n. 4 SUPPL., 2000. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11051136/>>. Acesso em: 9 maio 2021.

GUPTA, Aditya K.; JOSEPH, Warren S. Ciclopirox 8% nail lacquer in the treatment of onychomycosis of the toenails in the United States. *Journal of the American Podiatric Medical Association*, v. 90, n. 10, p. 495–501, 2000. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11107710/>>. Acesso em: 3 maio 2021.

GUPTA, Aditya K.; KONNIKOV, Nellie; LYNDE, Charles W. Single-blind, randomized, prospective study on terbinafine and itraconazole for treatment of dermatophyte toenail onychomycosis in the elderly. *Journal of the American Academy of Dermatology*, v. 44, n. 3, p. 479–484, 2001. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11209118/>>. Acesso em: 20 maio 2021.

GUPTA, Aditya K; PLOTT, Todd. Ciclopirox: a broad-spectrum antifungal with antibacterial and anti-inflammatory properties. *International Journal of Dermatology*, v. 43, p. 3–8, 2004.

GUPTA, Aditya K.; RYDER, Jennifer E. The use of oral antifungal agents to treat onychomycosis. *Dermatologic Clinics*, v. 21, n. 3, p. 469–479, 2003. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12956199/>>. Acesso em: 16 maio 2021.

GUPTA, Aditya K.; SIMPSON, Fiona C. Investigational drugs for onychomycosis. *Expert Opinion on Investigational Drugs*, v. 23, n. 1, p. 97–106, jan. 2014. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24070182/>>. Acesso em: 3 maio 2021.

GUPTA, Aditya K; SKINNER HBSC, Alayne R. Ciclopirox: a review of treating superficial dermatophytoses. *International Journal of Dermatology*, v. 42, p. 1461–1244, 2003.

GUPTA, Aditya K.; STUDHOLME, Catherine. Novel investigational therapies for onychomycosis: An update. *Expert Opinion on Investigational Drugs*, v. 25, n. 3, p. 297–305, 3 mar. 2016. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26765142/>>. Acesso em: 3 maio 2021.

GUPTA, Aditya K.; VERSTEEG, Sarah G. Tavaborole – a treatment for onychomycosis of the toenails. *Expert Review of Clinical Pharmacology*, v. 9, n. 9, p. 1145–1152, 1 set. 2016. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27347905/>>. Acesso em: 10 maio 2021.

GUPTA, Aditya K.; VERSTEEG, Sarah G.; SHEAR, Neil H. Onychomycosis in the 21st century: An update on diagnosis, epidemiology, and treatment. *Journal of Cutaneous Medicine and Surgery*, v. 21, n. 6, p. 525–539, 1 jun. 2017a.

GUPTA, Aditya K.; VERSTEEG, Sarah G.; SHEAR, Neil H. Onychomycosis in the 21st century: An update on diagnosis, epidemiology, and treatment. *Journal of Cutaneous Medicine and Surgery*, v. 21, n. 6, p. 525–539, 1 jun. 2017b. Disponível em: <<http://journals.sagepub.com/doi/10.1177/1203475417716362>>. Acesso em: 26 abr. 2021.

H, Wakamoto; M, Miyamoto. Development of a New Dermatophyte-Detection Device using Immunochromatography. *Journal of Medical Diagnostic Methods*, v. 05, n. 02, p. 1–9, 2016. Disponível em: <<https://www.longdom.org/abstract/development-of-a-new-dermatophytedetection-device-using-immunochromatography-30287.html>>. Acesso em: 16 maio 2021.

HAFEEZ, Farhaan *et al.* Ciclopirox delivery into the human nail plate using novel lipid diffusion enhancers. *Drug Development and Industrial Pharmacy*, v. 40, n. 6, p. 838–844, 2014.

HANEKE, Eckart; ROSEEUW, Diane. The scope of onychomycosis: Epidemiology and clinical features. *International Journal of Dermatology*, v. 38, n. SUPPL. 2, p. 7–12, 1999. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10515523/>>. Acesso em: 2 maio 2021.

HAO, Jinsong; LI, S. Kevin. Transungual iontophoretic transport of polar neutral and positively charged model permeants: Effects of electrophoresis and electroosmosis. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 97, n. 2, p. 893–905, 2008. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17683062/>>. Acesso em: 9 maio 2021.

HAO, Jinsong; SMITH, Kelly A.; LI, S. Kevin. Chemical method to enhance transungual transport and iontophoresis efficiency. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 357, n. 1–2, p. 61–69, 5 jun. 2008. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17683062/>>. Acesso em: 28 abr. 2021.

HAVU, V. *et al.* A double-blind, randomized study comparing itraconazole pulse therapy with continuous dosing for the treatment of toe-nail onychomycosis. *British Journal of Dermatology*, v. 136, n. 2, p. 230–234, 1 fev. 1997. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1046/j.1365-2133.1997.d01-1175.x>>. Acesso em: 20 maio 2021.

HAVU, V. *et al.* A double-blind, randomized study to compare the efficacy and safety of terbinafine (Lamisil®) with fluconazole (Diflucan®) in the treatment of onychomycosis. *British Journal of Dermatology*, v. 142, n. 1, p. 97–102, 2000. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10651701/>>. Acesso em: 3 maio 2021.

HAY, R. J.; MACKIE, R. M.; CLAYTON, Y. M. Tioconazole nail solution—an open study of its efficacy in onychomycosis. *Clinical and Experimental Dermatology*, v. 10, n. 2, p. 111–115, 1985. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/3156698/>>. Acesso em: 20 maio 2021.

HAY, Roderick J.; BARAN, Robert. Onychomycosis: A proposed revision of the clinical classification. *Journal of the American Academy of Dermatology*, v. 65, n. 6, p. 1219–1227, 1 dez. 2011. Acesso em: 2 maio 2021.

HAZEN, K C. New and emerging yeast pathogens. *Clinical microbiology reviews*, v. 8, n. 4, p. 462–478, 1995. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8665465/>>. Acesso em: 19 abr. 2021.

HIGASHI, Yuko *et al.* Evaluation of a newly-developed immunochromatography strip test for diagnosing dermatophytosis. *International Journal of Dermatology*, v. 51, n. 4, p. 406–409, abr. 2012. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22435427/>>. Acesso em: 16 maio 2021.

HUI, Xiaoying *et al.* Enhanced econazole penetration into human nail by 2-n-nonyl-1,3-dioxolane. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 92, n. 1, p. 142–148, 1 jan. 2003. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12486690/>>. Acesso em: 21 maio 2021.

IORIZZO, Matilde *et al.* Ciclopirox 8% HPCH Nail Lacquer in the Treatment of Mild-to-Moderate Onychomycosis: A Randomized, Double-Blind Amorolfine Controlled Study Using a Blinded Evaluator. *Skin Appendage Disorders*, v. 1, n. 3, p. 134–140, 2015. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27171791/>>. Acesso em: 16 maio 2021.

IWATA, K.; YAMAGUCHI, H. Studien zum mechanismus der antimyzetischen wirkung von ciclopiroxolamin. Hemmung des transports von aminosäuren, k⁺ und phosphaten durch die

zellmembran von candida albicans. *Arzneimittel-Forschung/Drug Research*, v. 31, n. 8 a, p. 1323–1327, 1 jan. 1981. Disponível em: <<https://europepmc.org/article/med/7028046>>. Acesso em: 23 abr. 2021.

JO SIU, William J. *et al.* Comparison of in vitro antifungal activities of efinaconazole and currently available antifungal agents against a variety of pathogenic fungi associated with onychomycosis. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 57, n. 4, p. 1610–1616, abr. 2013. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23318803/>>. Acesso em: 15 maio 2021.

JOHNSON, Melissa D. *et al.* Combination Antifungal Therapy. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 48, n. 3, p. 693–715, 1 mar. 2004. Disponível em: <<http://aac.asm.org/>>. Acesso em: 3 maio 2021.

KOBAYASHI, Yoichi *et al.* Enhancing effect of N-acetyl-L-cysteine or 2-mercaptoethanol on the in vitro permeation of 5-fluorouracil or tolnaftate through the human nail plate. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, v. 46, n. 11, p. 1797–1802, 1998. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9845958/>>. Acesso em: 28 abr. 2021.

KOBAYASHI, Yoichi *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, n. 4, p. 471–477, mar. 2004. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/14998577/>>. Acesso em: 9 maio 2021.

LACAZ, Carlos da Silva. *et al.* Tratado de micologia médica Lacaz. 2002. Acesso em: 27 dez. 2021.

LECHA, M. *et al.* Treatment options - Development of consensus guidelines. *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology*, v. 19, n. SUPPL. 1, p. 25–33, set. 2005. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16120203/>>. Acesso em: 3 maio 2021.

LECHA, Mario *et al.* An open-label, multicenter study of the combination of amorolfine nail lacquer and oral itraconazole compared with oral itraconazole alone in the treatment of severe toenail onychomycosis. *Current Therapeutic Research - Clinical and Experimental*, v. 63, n. 6, p. 366–379, 1 jun. 2002. Acesso em: 3 maio 2021.

LEE, Myung Hoon *et al.* Onychomycosis Caused by *Scopulariopsis brevicaulis* : Report of Two Cases. *Annals of Dermatology*, v. 24, n. 2, p. 209, 1 maio 2012. Disponível em: <<https://anndermatol.org/DOIx.php?id=10.5021/ad.2012.24.2.209>>. Acesso em: 26 abr. 2021.

LEE, Sang Won *et al.* Fungal melanonychia. *Journal of Dermatology*, v. 31, n. 11, p. 904–909, 2004. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15729863/>>. Acesso em: 2 maio 2021.

LEHR, K; DAWN, P. Quantification of ciclopirox olamine by high-performance liquid chromatography after pre-column derivatization. *J. Chromatogr.*, v. 339, p. 451–456, 1985.

LEUNG, Alexander K.C. *et al.* Onychomycosis: An Updated Review. *Recent Patents on Inflammation & Allergy Drug Discovery*, v. 14, n. 1, p. 32–45, 18 nov. 2020. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31738146/>>. Acesso em: 15 maio 2021.

LIPNER, Shari R. Pharmacotherapy for onychomycosis: new and emerging treatments. *Expert Opinion on Pharmacotherapy*, v. 20, n. 6, p. 725–735, 13 abr. 2019. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30689469/>>. Acesso em: 14 maio 2021.

LIPNER, Shari R.; SCHER, Richard K. Confirmatory testing for onychomycosis. *JAMA Dermatology*, v. 152, n. 7, p. 847, 1 jul. 2016a. Disponível em: <<https://jamanetwork.com/journals/jamadermatology/fullarticle/2533187>>. Acesso em: 2 maio 2021.

LIPNER, Shari R.; SCHER, Richard K. Long-standing onychodystrophy in a young woman. *JAMA - Journal of the American Medical Association*, v. 316, n. 18, p. 1915–1916, 8 nov. 2016b. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27824989/>>. Acesso em: 16 maio 2021.

LIPNER, Shari R.; SCHER, Richard K. Onychomycosis: Clinical overview and diagnosis. *Journal of the American Academy of Dermatology*, v. 80, n. 4, p. 835–851, 1 abr. 2019. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0190962218321881>>. Acesso em: 28 abr. 2021.

LOHAUS, G.; DITTMAR, W. ZUR CHEMIE VON ANTIMIKROBIELL WIRKSAMEN 1-HYDROXY-2-PYRIDONEN. *Arzneimittel-Forschung/Drug Research*, v. 31, n. 8 a, p. 1311–1316, 1 jan. 1981. Disponível em: <<https://europepmc.org/article/med/7197537>>. Acesso em: 18 abr. 2021.

LOPES BARBOSA, Mirlena *et al.* Uma lição de clínica médica através das unhas: lesões ungueais relacionadas à doenças sistêmicas. *Brazilian Journal of Surgery and Clinical Research-BJSCR*, v. 4, n. 1, p. 75–78, 2013. Disponível em: <<http://www.mastereditora.com.br/bjscr>>. Acesso em: 28 abr. 2021.

LUIS MENEZES CARVALHO, André. *Cinética de difusão in vitro e atividade in vivo de preparações magistrais de cetoprofeno*. 2007. 2007. Disponível em: <<https://repositorio.ufpe.br/handle/123456789/3518>>. Acesso em: 9 maio 2021.

LUSIANA; REICHL, Stephan; MÜLLER-GOYMANN, Christel C. Infected nail plate model made of human hair keratin for evaluating the efficacy of different topical antifungal formulations against *Trichophyton rubrum* in vitro. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, v. 84, n. 3, p. 599–605, ago. 2013. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23419812/>>. Acesso em: 15 maio 2021.

M38-A2 Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Filamentous Fungi; Approved Standard-Second Edition. Disponível em: <www.clsi.org>. Acesso em: 15 maio 2021.

MACROCHEM (MACM.OB). *Innovative topical drug delivery technologies*. Disponível em: <http://media.corporate-ir.net/media_files/irol/10/108108/CorporatePresentation121707.pdf>. Acesso em: 21 maio 2021.

MADDIN, Stuart; QUIRING, John; BULGER, Lynne. Randomized, placebo-controlled, phase 3 study of itraconazole for the treatment of onychomycosis. *Journal of Drugs in Dermatology*, v. 12, n. 7, p. 758–763, 1 jul. 2013. Disponível em: <<https://europepmc.org/article/med/23884486>>. Acesso em: 20 maio 2021.

MAGELA MAGALHÃES, Geraldo; BRASIL SUCCI, Isabel Cristina; JEUNON SOUSA, Maria Auxiliadora. Base for the histopathological study of nail lesions. *Anais Brasileiros de Dermatologia*, v. 78, n. 1, p. 49–61, 2003. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0365-05962003000100005&lng=en&nrm=iso&tlng=en>. Acesso em: 28 abr. 2021.

MALAY, D. Scot *et al.* Efficacy of Debridement Alone Versus Debridement Combined with Topical Antifungal Nail Lacquer for the Treatment of Pedal Onychomycosis: A Randomized, Controlled Trial. *Journal of Foot and Ankle Surgery*, v. 48, n. 3, p. 294–308, 1 maio 2009. Acesso em: 20 maio 2021.

MARKUS, A. Hydroxy-Pyridones Outstanding Biological Properties. *Hydroxy-Pyridones as Antifungal Agents with Special Emphasis on Onychomycosis*. [S.l.]: Springer Berlin Heidelberg, 1999. p. 1–10. Disponível em: <https://link.springer.com/chapter/10.1007/978-3-642-58401-5_1>. Acesso em: 23 abr. 2021.

MATSUDA, Yoshiki *et al.* Efficacy coefficients determined using nail permeability and antifungal activity in keratin-containing media are useful for predicting clinical efficacies of topical drugs for onychomycosis. *PLoS ONE*, v. 11, n. 7, 1 jul. 2016.

MÉHUL, Bruno *et al.* Detection of *Trichophyton rubrum* and *Trichophyton interdigitale* in onychomycosis using monoclonal antibodies against Sub6 (Tri r 2). *Mycoses*, v. 62, n. 1, p. 32–40, 1 jan. 2019. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30152879/>>. Acesso em: 16 maio 2021.

MÉHUL, Bruno *et al.* Sub6 (Tri r 2), an onychomycosis marker revealed by proteomics analysis of *trichophyton rubrum* secreted proteins in patient nail samples. *Journal of Investigative Dermatology*, v. 136, n. 1, p. 331–333, 1 jan. 2016. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26763458/>>. Acesso em: 16 maio 2021.

MERCER, Derry K. *et al.* Improved methods for assessing therapeutic potential of antifungal agents against dermatophytes and their application in the development of NP213, a novel onychomycosis therapy candidate. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 63, n. 5, 1 maio 2019. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30858219/>>. Acesso em: 15 maio 2021.

MERTIN, Dirk; LIPPOLD, Bernhard C. In-vitro permeability of the human nail and of a keratin membrane from bovine hooves: Prediction of the penetration rate of antimycotics through the nail plate and their efficacy. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, v. 49, n. 9, p. 866–872, 1997. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9306253/>>. Acesso em: 5 maio 2021.

MIKAILOV, Anar *et al.* Cost-effectiveness of confirmatory testing before treatment of onychomycosis. *JAMA Dermatology*, v. 152, n. 3, p. 276–281, 1 mar. 2016. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26716567/>>. Acesso em: 10 maio 2021.

MOBERG PHARMA AB. *Moberg Pharma meets primary endpoint for MOB-015 in a Phase 3 study for the treatment of onychomycosis* . . [S.l.: s.n.]. Disponível em: <<https://news.cision.com/moberg-pharma/r/moberg-pharma-meets-primaryendpoint-for-mob-015-in-a-phase-3-study-for-the-treatment-of-onychomycosis,c2984987>>. Acesso em: 1 jun. 2021. , 2019

MOFFITT, D. L.; DE BERKER, D. A.R. Yellow nail syndrome: The nail that grows half as fast grows twice as thick. *Clinical and Experimental Dermatology*, v. 25, n. 1, p. 21–23, 2000. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10671964/>>. Acesso em: 12 maio 2021.

MOGENSEN, M. *et al.* Nail thickness measurements using optical coherence tomography and 20-MHz ultrasonography. *British Journal of Dermatology*, v. 157, n. 5, p. 894–900, nov.

2007. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17714567/>>. Acesso em: 12 maio 2021.

MONOD, M. *et al.* Direct mycological examination in dermatology: A comparison of different methods. *Dermatology*, v. 179, n. 4, p. 183–186, 1989. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/2695355/>>. Acesso em: 16 maio 2021.

MONOD, Michel *et al.* Fast and reliable PCR/sequencing/RFLP assay for identification of fungi in onychomycoses. *Journal of Medical Microbiology*, v. 55, n. 9, p. 1211–1216, set. 2006. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16914650/>>. Acesso em: 2 maio 2021.

MONOD, Michel; MÉHUL, Bruno. Recent findings in onychomycosis and their application for appropriate treatment. *Journal of Fungi*, v. 5, n. 1, 1 mar. 2019. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30813287/>>. Acesso em: 15 maio 2021.

MONTI, D. *et al.* Hydrosoluble medicated nail lacquers: In vitro drug permeation and corresponding antimycotic activity. *British Journal of Dermatology*, v. 162, n. 2, p. 311–317, fev. 2010.

MONTI, D. *et al.* Nail penetration and predicted mycological efficacy of an innovative hydrosoluble ciclopirox nail lacquer vs. a standard amorolfine lacquer in healthy subjects. *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology*, v. 27, n. 2, fev. 2013. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22449201/>>. Acesso em: 16 maio 2021.

MONTI, D. *et al.* Validation of bovine hoof slices as a model for infected human toenails: In vitro ciclopirox transungual permeation. *British Journal of Dermatology*, v. 165, n. 1, p. 99–105, jul. 2011.

MONTI, Daniela *et al.* Ciclopirox and Efinaconazole Transungual Permeation, Antifungal Activity, and Proficiency To Induce Resistance in *Trichophyton rubrum*. 2019

MONTI, Daniela *et al.* Ciclopirox and Efinaconazole Transungual Permeation, Antifungal Activity, and Proficiency To Induce Resistance in *Trichophyton rubrum*. 2019c. Disponível em: <<https://doi.org/10>>.

MULLER, J.; POLAK-WYSS, A.; MELCHINGER, W. Influence of amorolfine on the morphology of *Candida albicans* and *Trichophyton mentagrophytes*. *Dermatology*, v. 184, n. SUPPL. 1, p. 8–17, 1992. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/1550969/>>. Acesso em: 3 maio 2021.

MURDAN, Sudaxshina. Drug delivery to the nail following topical application. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 236, n. 1–2, p. 1–26, 2 abr. 2002. Acesso em: 3 maio 2021.

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

MURTHY, S Narasimha; MAIBACH, Howard I. *Topical Nail Products and Ungual Drug Delivery*. 1st Edition ed. [S.l: s.n.], 2012.

MURTHY, S. Narasimha; WISKIRCHEN, Dora E.; BOWERS, Christopher Paul. Iontophoretic drug delivery across human nail. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 96, n. 2, p. 305–311, 2007. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17080425/>>. Acesso em: 9 maio 2021.

NAIR, Anroop B. *et al.* A comprehensive study to evaluate the effect of constant low voltage iontophoresis on transungual delivery. *Drug Development and Industrial Pharmacy*, v. 39, n. 5, p. 807–815, maio 2013.

NIEWERTH, Markus *et al.* Ciclopirox olamine treatment affects the expression pattern of *Candida albicans* genes encoding virulence factors, iron metabolism proteins, and drug resistance factors. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 47, n. 6, p. 1805–1817, 1 jun. 2003.

NOGUEIRAS-NIETO, L. *et al.* Hydration and N-acetyl-l-cysteine alter the microstructure of human nail and bovine hoof: Implications for drug delivery. *Journal of Controlled Release*, v. 156, n. 3, p. 337–344, 20 dez. 2011. Acesso em: 5 maio 2021.

NOGUEIRAS-NIETO, Luis; BEGOÑA DELGADO-CHARRO, M.; OTERO-ESPINAR, Francisco J. Thermogelling hydrogels of cyclodextrin/poloxamer polypseudorotaxanes as aqueous-based nail lacquers: Application to the delivery of triamcinolone acetonide and ciclopirox olamine. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, v. 83, n. 3, p. 370–377, abr. 2013.

NORIKI, Sakon; ISHIDA, Hisaya. Production of an anti-dermatophyte monoclonal antibody and its application: Immunochromatographic detection of dermatophytes. *Medical Mycology*, v. 54, n. 8, p. 808–815, 1 nov. 2016. Disponível em: <<https://academic.oup.com/mmy/article/54/8/808/2579198>>. Acesso em: 16 maio 2021.

OBED MARTÍNEZ-HERRERA, Erick *et al.* INVESTIGATION Onychomycosis due to opportunistic molds *. *An Bras Dermatol*, v. 90, n. 3, p. 334–341, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1590/abd1806-4841.20153521>>. Acesso em: 26 abr. 2021.

Onychomycosis - StatPearls - NCBI Bookshelf. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK441853/>>. Acesso em: 2 maio 2021.

ORTNER, Vincent K. *et al.* Morphometric Optical Imaging of Microporated Nail Tissue: An Investigation of Intermethod Agreement, Reliability, and Technical Limitations. *Lasers in Surgery and Medicine*, v. 53, n. 6, p. 838–848, 8 ago. 2021.

PALACIO-HERNANZ, A. Del *et al.* Changes in fungal ultrastructure after short-course ciclopiroxolamine therapy in pityriasis versicolor. *Clinical and Experimental Dermatology*, v. 15, n. 2, p. 95–100, 1990. Acesso em: 23 abr. 2021.

PALLIYIL, Biji B. *et al.* Lateral Drug Diffusion in Human Nails. *Ageing International*, v. 15, n. 6, p. 1429–1438, 27 nov. 2014.

PALLIYIL, Biji; LEBO, David B.; PATEL, Pankil R. A preformulation strategy for the selection of penetration enhancers for a transungual formulation. *AAPS PharmSciTech*, v. 14, n. 2, p. 682–691, 2013.

PFALLER, M.; WENZEL, R. Impact of the changing epidemiology of fungal infections in the 1990s. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*, v. 11, n. 4, p. 287–291, abr. 1992. Disponível em: <<https://link.springer.com/article/10.1007/BF01962067>>. Acesso em: 19 abr. 2021.

PIRACCINI, Bianca Maria; SISTI, Andrea; TOSTI, Antonella. Long-term follow-up of toenail onychomycosis caused by dermatophytes after successful treatment with systemic antifungal agents. *Journal of the American Academy of Dermatology*, v. 62, n. 3, p. 411–414, mar. 2010. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20159308/>>. Acesso em: 16 maio 2021.

POLAK, Annemarie. Kinetics of amorolfine in human nails: Die Amorolfin-Kinetik in Nageln des Menschen. *Mycoses*, v. 36, n. 3–4, p. 101–103, 1993. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8366874/>>. Acesso em: 3 maio 2021.

POLAT, Muhterem; İLHAN, Mustafa N; POLAT, Assoc Muhterem. Dermatological Complaints of the Elderly Attending a Dermatology Outpatient Clinic in Turkey: A Prospective Study over a One-year Period. *Acta Dermatovenerol Croat*, v. 23, n. 4, p. 277–281, 2015. Acesso em: 2 maio 2021.

QUINTANAR-GUERRERO, David *et al.* The effect of keratolytic agents on the permeability of three imidazole antimycotic drugs through the human nail. *Drug Development and Industrial Pharmacy*, v. 24, n. 7, p. 685–690, 1998. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9876516/>>. Acesso em: 4 maio 2021.

REARDON, C. M. *et al.* The surface anatomy of the germinal matrix of the nail bed in the finger. *Journal of Hand Surgery*, v. 24 B, n. 5, p. 531–533, 1999. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10597925/>>. Acesso em: 12 maio 2021.

REISBERGER, E. M. *et al.* Histopathological diagnosis of onychomycosis by periodic acid-Schiff-stained nail clippings. *British Journal of Dermatology*, v. 148, n. 4, p. 749–754, 1 abr. 2003. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12752134/>>. Acesso em: 2 maio 2021.

REPKA, Michael A. *et al.* Nail morphology studies as assessments for onychomycosis treatment modalities. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 245, n. 1–2, p. 25–36, 1 out. 2002. Acesso em: 9 maio 2021.

RICH, Phoebe; TOSTI, Antonella; SCHER, Richard. Onychomycosis: an overview. *Journal of drugs in dermatology*, 2013.

ROBERTS; EVANS. Subungual dermatophytoma complicating dermatophyte onychomycosis. *British Journal of Dermatology*, v. 138, n. 1, p. 189–190, 1 jan. 1998. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1046/j.1365-2133.1998.02050.x>>. Acesso em: 2 maio 2021.

ROSEN, Theodore *et al.* Onychomycosis: Epidemiology, diagnosis, and treatment in a changing landscape. *Journal of Drugs in Dermatology*, v. 14, n. 3, p. 223–228, 1 mar. 2015. Disponível em: <<https://europepmc.org/article/med/25738843>>. Acesso em: 26 abr. 2021.

RUIZ, Ligia Rangel B.; CHIACCHIO, Nilton Di. Manual de conduta nas onicomicoses: Diagnóstico e tratamento. 2005.

SABOURAUD, R. Les teignes. *Masson*, 1910.

SAKURAI, Kyoko *et al.* Mode of action of 6-Cyclohexyl-l-hydroxy-4-methyl-2(1H)-pyridone Ethanolamine salt (Hoe 296). *Chemotherapy*, v. 24, n. 2, p. 68–76, 1978. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/340169/>>. Acesso em: 23 abr. 2021.

SAMMAN, PETER D.; STRICKLAND, BASIL. ABNORMALITIES OF THE FINGER NAILS ASSOCIATED WITH IMPAIRED PERIPHERAL BLOOD SUPPLY. *British Journal of Dermatology*, v. 74, n. 5, p. 165–173, 1 maio 1962. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/j.1365-2133.1962.tb13484.x>>. Acesso em: 12 maio 2021.

SANGIORGI, Simone *et al.* Microvascularization of the human digit as studied by corrosion casting. *Journal of Anatomy*, v. 204, n. 2, p. 123–131, fev. 2004. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15032919/>>. Acesso em: 12 maio 2021.

SCHÄFER-KORTING, Monika *et al.* The use of reconstructed human epidermis for skin absorption testing: Results of the validation study. *ATLA Alternatives to Laboratory Animals*, v. 36, n. 2, p. 161–187, 2008. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18522484/>>. Acesso em: 20 maio 2021.

SCHER, R. K.; BARAN, R. Onychomycosis in clinical practice: Factors contributing to recurrence. *British Journal of Dermatology, Supplement*, v. 149, n. 65, p. 5–9, 2003. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/14510969/>>. Acesso em: 16 maio 2021.

SCHERER, William P.; MCCREARY, Jon P.; HAYES, Walter W. The diagnosis of onychomycosis in a geriatric population: A study of 450 cases in South Florida. *Journal of the American Podiatric Medical Association*, v. 91, n. 9, p. 456–464, 2001. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11679627/>>. Acesso em: 16 maio 2021.

SHAFRITZ, Adam B.; COPPAGE, Jeff M. Acute and chronic paronychia of the hand. *Journal of the American Academy of Orthopaedic Surgeons*, v. 22, n. 3, p. 165–174, 1 mar. 2014. Acesso em: 12 maio 2021.

SHAHZAD, Muhammad *et al.* Onychomycosis in Qassim region of Saudi Arabia: A clinicoaetiologic correlation. *Journal of Clinical and Diagnostic Research*, v. 8, n. 8, p. YC01, 2014. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/261490778/>>. Acesso em: 10 maio 2021.

SHANBHAG, Pradnya Palekar; JANI, Urvi. Drug delivery through nails: Present and future. *New Horizons in Translational Medicine*, v. 3, n. 5, p. 252–263, 1 jan. 2017. Acesso em: 19 maio 2021.

SHEMER, Avner *et al.* Ciclopirox nail lacquer for the treatment of onychomycosis: An open non-comparative study. *Journal of Dermatology*, v. 37, n. 2, p. 137–139, fev. 2010. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20175847/>>. Acesso em: 3 maio 2021.

SHIMAMURA, Tsuyoshi *et al.* Establishment of a novel model of onychomycosis in rabbits for evaluation of antifungal agents. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 55, n. 7, p. 3150–3155, jul. 2011. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21555762/>>. Acesso em: 15 maio 2021.

SHIVAKUMAR, H. N. *et al.* Ungual and Transungual drug delivery. *Drug Development and Industrial Pharmacy*, v. 38, n. 8, p. 901–911, ago. 2012. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22149347/>>. Acesso em: 28 abr. 2021.

SHUSTER, Sam. The significance of chevron nails. *British Journal of Dermatology*, v. 135, n. 1, p. 151–152, jul. 1996. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8776388/>>. Acesso em: 12 maio 2021.

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

SIGURGEIRSSON, B.; BARAN, R. The prevalence of onychomycosis in the global population – A literature study. *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology*, v. 28, n. 11, p. 1480–1491, 1 nov. 2014. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24283696/>>. Acesso em: 17 maio 2021.

SIGURGEIRSSON, Bárður; GHANNOUM, Mahmoud. Therapeutic potential of TDT 067 (terbinafine in Transfersome®): A carrier-based dosage form of terbinafine for onychomycosis. *Expert Opinion on Investigational Drugs*, v. 21, n. 10, p. 1549–1562, out. 2012. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22876754/>>. Acesso em: 16 maio 2021.

SIGURGEIRSSON, Bárður *et al.* Long-term effectiveness of treatment with terbinafine vs itraconazole in onychomycosis: A 5-year blinded prospective follow-up study. *Archives of Dermatology*, v. 138, n. 3, p. 353–357, 2002. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11902986/>>. Acesso em: 16 maio 2021.

SLEVEN, Reindert *et al.* Development of a novel in vitro onychomycosis model for the evaluation of topical antifungal activity. *Journal of Microbiological Methods*, v. 112, p. 73–75, 1 maio 2015. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25772040/>>. Acesso em: 15 maio 2021.

SMITH, Kelly A.; HAO, Jinsong; LI, S. Kevin. Influence of pH on transungual passive and iontophoretic transport. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 99, n. 4, p. 1955–1967, 2010. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/2043382/>>. Acesso em: 24 maio 2021.

SOLÍS-ARIAS, Martha Patricia; GARCÍA-ROMERO, Maria Teresa. Onychomycosis in children. A review. *International Journal of Dermatology*, v. 56, n. 2, p. 123–130, 1 fev. 2017. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27612431/>>. Acesso em: 15 maio 2021.

SOUZA, L. K.H. *et al.* Epidemiological and mycological data of onychomycosis in Goiania, Brazil. *Mycoses*, v. 53, n. 1, p. 68–71, jan. 2010. Acesso em: 11 maio 2021.

STERN, Dana K. *et al.* UV-A and UV-B penetration of normal human cadaveric fingernail plate. *Archives of Dermatology*, v. 147, n. 4, p. 439–441, abr. 2011. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21173303/>>. Acesso em: 12 maio 2021.

SUGIURA, Keita *et al.* The low keratin affinity of efinaconazole contributes to its nail penetration and fungicidal activity in topical onychomycosis treatment. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 58, n. 7, p. 3837–3842, 2014. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24752277/>>. Acesso em: 20 maio 2021.

SUGIURA, Keita *et al.* The low keratin affinity of efinaconazole contributes to its nail penetration and fungicidal activity in topical onychomycosis treatment. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 58, n. 7, p. 3837–3842, 2014c.

TATSUMI, Yoshiyuki *et al.* Therapeutic efficacy of topically applied KP-103 against experimental tinea unguium in guinea pigs in comparison with amorolfine and terbinafine. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 46, n. 12, p. 3797–3801, 1 dez. 2002. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12435679/>>. Acesso em: 15 maio 2021.

TÄUBER, Anja; MÜLLER-GOYMANN, Christel C. In vitro evaluation of the antifungal efficacy of poloxamer 407-based formulations in an infected nail plate model. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 505, n. 1–2, p. 20–23, 30 maio 2016. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26992819/>>. Acesso em: 15 maio 2021.

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

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

THATAI, Purva; SAPRA, Bharti. Terbinafine hydrochloride nail lacquer for the management of onychomycosis: Formulation, characterization and in vitro evaluation. *Therapeutic*

Delivery, v. 9, n. 2, p. 99–118, 1 fev. 2018. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29325509/>>. Acesso em: 16 maio 2021.

THERASKIN®. [BULA] Microlamina® nail lacquer. 2020. Acesso em: 13 jan. 2022.

THOMAS, J. *et al.* Toenail onychomycosis: An important global disease burden. *Journal of Clinical Pharmacy and Therapeutics*, v. 35, n. 5, p. 497–519, out. 2010. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20831675/>>. Acesso em: 10 maio 2021.

THOMAS, Jackson *et al.* Antifungal Drug Use for Onychomycosis. *American Journal of Therapeutics*, v. 26, n. 3, p. E388–E396, 1 maio 2019. Disponível em: <https://journals.lww.com/americantherapeutics/Fulltext/2019/06000/Antifungal_Drug_Use_for_Onychomycosis.13.aspx>. Acesso em: 17 maio 2021.

TORKAR, Ana; KRISTL, Julijana; MURDAN, Sudaxshina. Low-frequency ultrasound to enhance topical drug delivery to the nail. [S.d.]. Acesso em: 9 maio 2021.

TRAYNOR, M.J. *et al.* Effect of a novel penetration enhancer on the ungual permeation of two antifungal agents. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, v. 62, n. 6, p. 730–737, jun. 2010. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20636860/>>. Acesso em: 15 maio 2021.

TSUNEMI, Yuichiro; HIRUMA, Masataro. Clinical study of Dermatophyte Test Strip, an immunochromatographic method, to detect tinea unguium dermatophytes. *Journal of Dermatology*, v. 43, n. 12, p. 1417–1423, 1 dez. 2016. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26992478/>>. Acesso em: 16 maio 2021.

ULBRICHT, H; WORZ, K. [Therapy with ciclopirox lacquer of onychomycoses caused by molds]. *Mycoses*, v. 37 Suppl 1, n. 0933-7407 (Print), p. 97–100, 1 jan. 1994. Disponível em: <<https://europepmc.org/article/med/7854374>>. Acesso em: 3 maio 2021.

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

VERA, JR Maestre; CERVERA, L Alou. Ventajas y desventajas de los antifúngicos de uso tópico. *JR Prous*, 2001.

VERRIER, Julie *et al.* Identification of infectious agents in onychomycoses by PCR-terminal restriction fragment length polymorphism. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 50, n. 3, p.

553–561, mar. 2012. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22170903/>>. Acesso em: 16 maio 2021.

VERRIER, Julie; MONOD, Michel. Diagnosis of Dermatophytosis Using Molecular Biology. *Mycopathologia*, v. 182, n. 1–2, p. 193–202, 1 fev. 2017. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27480761/>>. Acesso em: 16 maio 2021.

WALTERS, K. A.; FLYNN, G. L. Permeability characteristics of the human nail plate. *International Journal of Cosmetic Science*, v. 5, n. 6, p. 231–246, 1983. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19469991/>>. Acesso em: 22 maio 2021.

WALTERS, Kenneth A.; FLYNN, Gordon L.; MARVEL, John R. Physicochemical characterization of the human nail: solvent effects on the permeation of homologous alcohols. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, v. 37, n. 11, p. 771–775, 1985. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/2867157/>>. Acesso em: 9 maio 2021.

WATANABE, Shinichi; TSUBOUCHI, Ichiro; OKUBO, Akihiro. Efficacy and safety of fosravuconazole L-lysine ethanolate, a novel oral triazole antifungal agent, for the treatment of onychomycosis: A multicenter, double-blind, randomized phase III study. *Journal of Dermatology*, v. 45, n. 10, p. 1151–1159, 1 out. 2018. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30156314/>>. Acesso em: 16 maio 2021.

WESTERBERG, Dyanne P; VOYACK, Michael J. Onychomycosis: Current Trends in Diagnosis and Treatment. *American Family Physician*, v. 88, n. 11, p. 762–770, 1 dez. 2013. Disponível em: <www.aafp.org/afp>. Acesso em: 28 abr. 2021.

ZAIAS, N. Onychomycosis. *Dermatologic Clinics*, v. 3, n. 3, p. 445–460, 1 jul. 1985. Acesso em: 28 abr. 2021.

ZALACAIN, A. *et al.* Characterization of the antimicrobial susceptibility of fungi responsible for onychomycosis in Spain. *Medical Mycology*, v. 49, n. 5, p. 495–499, jul. 2011. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21142899/>>. Acesso em: 15 maio 2021.

APÊNDICE A – TABELA COM MICs DE ANTIFÚNGICOS USADOS NO TRATAMENTO DE ONICOMICOSE

Fármaco	CIM (µg/mL)		
	<i>Trichophyton rubrum</i>	<i>Trichophyton mentagrophytes</i>	<i>Candida albicans</i>
Amorolfina	0,016 – 0,031 ⁽¹⁾	0,031 – 0,25 ⁽¹⁾	0,063 – 4 ⁽¹⁾
	0,004–0,015 ⁽²⁾	0,004–0,06 ⁽²⁾	0,03–8 ⁽²⁾
	0,125-0,5 ⁽²¹⁾		
Ciclopirox Olamina	0,03–0,5 ⁽²⁾	0,03–0,5 ⁽²⁾	0,06–0,5 ⁽²⁾
	0,06–1,0 ⁽³⁾	0,125–0,5 ⁽³⁾	0,9–3,9 ⁽¹³⁾
	0,125–0,25 ⁽⁴⁾	0,125–1,0 ⁽⁴⁾	0,06–0,25 ⁽¹⁴⁾
	0,5–3,9 ⁽¹³⁾	0,9–3,9 ⁽¹³⁾	0,03 ⁽¹⁵⁾
	0,125 ⁽¹⁴⁾	0,06–0,125 ⁽¹⁴⁾	2–4 ⁽¹⁸⁾
	0,015–0,125 ⁽¹⁵⁾	0,03–0,125 ⁽¹⁵⁾	1–4 ⁽¹⁹⁾
	0,25–0,5 ⁽¹⁶⁾	0,25–1,0 ⁽¹⁶⁾	0,125–0,6 ⁽²⁰⁾
	0,125–0,5 ⁽¹⁷⁾	0,06–0,25 ⁽¹⁷⁾	
	0,125 ⁽²⁰⁾		
Fluconazol	1 - 32 ⁽⁴⁾	4 -16 ⁽⁴⁾	0,12 – 8 ⁽⁶⁾
	1 – 64 ⁽⁵⁾	16 – 64 ⁽⁵⁾	0,125 – 4 ⁽⁵⁾
			0,125–2 ⁽¹⁸⁾
			0,125–64 ⁽¹⁹⁾
Terbinafina	0,002 – 0,0078 ⁽¹⁾	0,002 – 0,031 ⁽¹⁾	2 - 8 ⁽¹⁾
			16–128 ⁽¹⁸⁾
			>2 ⁽¹⁵⁾
			1–4 ⁽¹⁹⁾
Tioconazol	0.3-12.5 ⁽²²⁾	0.08-0.18 ⁽²⁶⁾	0.78-6.25 ⁽²²⁾
	0.5 ⁽²⁶⁾	0.2-0.7 ⁽²⁷⁾	0.19 ⁽²³⁾
	0.1-0.7 ⁽²⁷⁾		0.06 ⁽²⁴⁾
	0.5 ⁽²⁸⁾		0.3 ⁽²⁵⁾
			1.6-12.59 ⁽²⁶⁾
			0.1-3.0 ⁽²⁷⁾
Miconazol	0,5 – 32 ⁽⁷⁾	-	0,03 – 1 ⁽⁶⁾
Clotrimazol	0,031 – 0,063 ⁽¹⁾	0,016 -0,5 ⁽¹⁾	0,0039 – 0,031 ⁽¹⁾
	0,0625–1,0 ⁽⁸⁾	0,125–0,25 ⁽⁸⁾	0.03 – 1 ⁽⁶⁾
	0,0625–0,25 ⁽⁷⁾		
Luliconazol (sob patente)	0,00012 – 0,00024 ⁽¹⁾	0,00049 – 0,002 ⁽¹⁾	0,031 – 0,13 ⁽¹⁾
Econazol	0,2 – 1,56 ⁽²²⁾	-	0,78 – 3,12 ⁽²²⁾

¹ KOGA, Hiroyasu et al. In vitro antifungal activities of luliconazole, a new topical imidazole. **Medical mycology**, v. 47, n. 6, p. 640-647, 2009.

² SIU, William J. Jo et al. Comparison of in vitro antifungal activities of efinaconazole and currently available antifungal agents against a variety of pathogenic fungi associated with onychomycosis. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 57, n. 4, p. 1610-1616, 2013.

³ SANDERS, V.; BAKER, S.; ALLEY, M. Microbiological activity of AN2690, a new antifungal agent in development for the topical treatment of onychomycosis [poster]. 2013.

⁴ LISCANO, Mari Gleí Hernandez et al. Suscetibilidade de *Trichophyton rubrum* e *Trichophyton mentagrophytes* frente a agentes antifúngicos. 2015.

⁵ BUENO, J. G. et al. In vitro activity of fluconazole, itraconazole, voriconazole and terbinafine against fungi causing onychomycosis. **Clinical and Experimental Dermatology: Experimental dermatology**, v. 35, n. 6, p. 658-663, 2010.

⁶ DE CASTRO, Issis Maria Nogueira. Comparação da atividade de antifúngicos imidazólicos e triazólicos frente a *Candida albicans*. RBAC, v. 48, n. 3, p. 216-22, 2016.

⁷ GRISOLIA, Maria Eduarda et al. **Perfil de sensibilidade aos antifúngicos e de variabilidade genética de espécies de *Trichophyton* isolados de pacientes com infecção cutânea atendidos em um Serviço Público de Micologia em Manaus/AM**. 2019. Tese de Doutorado.

⁸ TATSUMI, Yoshiyuki et al. In vitro antifungal activity of KP-103, a novel triazole derivative, and its therapeutic efficacy against experimental plantar tinea pedis and cutaneous candidiasis in guinea pigs. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 45, n. 5, p. 1493-1499, 2001.

⁹ ELSAYED, Mustafa MA. 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.

¹⁰ TATSUMI, Yoshiyuki et al. Therapeutic efficacy of topically applied KP-103 against experimental tinea unguium in guinea pigs in comparison with amorolfine and terbinafine. **Antimicrobial agents and Chemotherapy**, v. 46, n. 12, p. 3797-3801, 2002.

¹¹ NEUBERT, R. H. H. et al. Different physicochemical properties of antimycotic agents are relevant for penetration into and through human nails. **Die Pharmazie-An International Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 61, n. 7, p. 604-607, 2006.

¹² HOSSIN, B.; RIZI, K.; MURDAN, S. Application of Hansen Solubility Parameters to predict drug–nail interactions, which can assist the design of nail medicines. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 102, p. 32-40, 2016.

¹³ JUE, S. G.; DAWSON, G. W.; BROGDEN, R. N. Ciclopirox olamine 1% cream. **Drugs**, v. 29, n. 4, p. 330-341, 1985.

- ¹⁴ KOKJOHN, Katrina et al. Evaluation of in vitro activity of ciclopirox olamine, butenafine HCl and econazole nitrate against dermatophytes, yeasts and bacteria. **International journal of dermatology**, v. 42, n. S1, p. 11-17, 2003.
- ¹⁵ GUPTA, Aditya K.; KOHLI, Y. In vitro susceptibility testing of ciclopirox, terbinafine, ketoconazole and itraconazole against dermatophytes and nondermatophytes, and in vitro evaluation of combination antifungal activity. **British Journal of dermatology**, v. 149, n. 2, p. 296-305, 2003.
- ¹⁶ SINGH, Jagpal; ZAMAN, Muhammad; GUPTA, Aditya K. Evaluation of microdilution and disk diffusion methods for antifungal susceptibility testing of dermatophytes. **Medical mycology**, v. 45, n. 7, p. 595-602, 2007.
- ¹⁷ SHEHATA, Atef S.; MUKHERJEE, Pranab K.; GHANNOUM, Mahmoud A. Comparison between the standardized clinical and laboratory standards institute M38-A2 method and a 2, 3-Bis (2-Methoxy-4-Nitro-5-[(Sulphenylamino) Carbonyl]-2H-tetrazolium hydroxide-based method for testing antifungal susceptibility of dermatophytes. **Journal of clinical microbiology**, v. 46, n. 11, p. 3668-3671, 2008.
- ¹⁸ CZAIIKA, V. et al. Antifungal susceptibility testing in chronically recurrent vaginal candidosis as basis for effective therapy. **Mycoses**, v. 43, p. 45-50, 2000.
- ¹⁹ FIGUEIREDO, Valda Teixeira et al. Identification and in vitro antifungal susceptibility testing of 200 clinical isolates of *Candida* spp. responsible for fingernail infections. **Mycopathologia**, v. 164, n. 1, p. 27-33, 2007.
- ²⁰ KOKJOHN, Katrina et al. Evaluation of in vitro activity of ciclopirox olamine, butenafine HCl and econazole nitrate against dermatophytes, yeasts and bacteria. **International journal of dermatology**, v. 42, n. S1, p. 11-17, 2003.
- ²¹ SCHALLER, Martin et al. Susceptibility testing of amorolfine, bifonazole and ciclopiroxolamine against *Trichophyton rubrum* in an in vitro model of dermatophyte nail infection. **Sabouraudia**, v. 47, n. 7, p. 753-758, 2009.
- ²² GRIGORIU, D.; GRIGORIU, A. Double-blind comparison of the efficacy, toleration and safety of tioconazole base 1% and econazole nitrate 1% creams in the treatment of patients with fungal infections of the skin or erythrasma. **Dermatology**, v. 166, n. Suppl. 1, p. 8-13, 1983.

- ²³ LEFLER, E.; STEVENS, DAVID A. Inhibition and killing of *Candida albicans* in vitro by five imidazoles in clinical use. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 25, n. 4, p. 450-454, 1984.
- ²⁴ ROSATO, Antonio et al. In vitro synergy testing of anidulafungin with fluconazole, tioconazole, 5-flucytosine and amphotericin B against some *Candida* spp. **Medicinal Chemistry**, v. 8, n. 4, p. 690-698, 2012.
- ²⁵ ABOUL-ENEIN, Mohamed Nabil et al. Synthesis and Anti-*Candida* Potential of Certain Novel 1-[(3-Substituted-3-phenyl) propyl]-1H-imidazoles. **Archiv der Pharmazie**, v. 344, n. 12, p. 794-801, 2011.
- ²⁶ JEVONS, S. et al. Antifungal activity of tioconazole (UK-20,349), a new imidazole derivative. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 15, n. 4, p. 597-602, 1979.
- ²⁷ FREDRIKSSON, Torsten. Treatment of dermatomycoses with topical tioconazole and miconazole. **Dermatology**, v. 166, n. Suppl. 1, p. 14-19, 1983.
- ²⁸ FACHIN, A. L.; CONTEL, E. P. B.; MARTINEZ-ROSSI, N. M. Effect of sub-MICs of antimycotics on expression of intracellular esterase of *Trichophyton rubrum*. **Sabouraudia**, v. 39, n. 1, p. 129-133, 2001.

APÊNDICE B – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

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

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (PARA MAIORES DE 18 ANOS OU EMANCIPADOS)

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

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

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

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

INFORMAÇÕES SOBRE A PESQUISA:

Descrição da pesquisa:

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

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

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

Os objetivos específicos são:

Desenvolver uma série de formulações de modo a:

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

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

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

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

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

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

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

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

- **RISCOS diretos** para o voluntário (prejuízo, desconforto, constrangimento, lesões que podem ser provocados pela pesquisa) **informando as formas de amenizar os riscos bem como indenização, ressarcimento de despesas em caso de dano.**

Não há efeitos colaterais ou riscos esperados de sua participação neste estudo, além daqueles associados ao corte de unhas. Algumas pessoas podem achar pouco prático ou desagradável ter unhas compridas. Você pode se sentir inconveniente de ter unhas muito curtas logo após o corte das mesmas.

- **BENEFÍCIOS diretos e indiretos** para os voluntários.

Não há benefício direto para você como resultado de sua participação. Este é um estudo preliminar que, com sorte, nos ajudará a desenvolver maneiras/medicamentos mais eficazes de tratar infecções por fungos nas unhas. Desta forma, existe um benefício potencial para o público em geral no futuro, especialmente para aqueles que sofrem de infecções de unha causadas por fungos, caso as novas abordagens e aprimoramento de formulação demonstrarem melhorar a penetração do medicamento na unha.

Todas as informações desta pesquisa serão confidenciais e serão divulgadas apenas em eventos ou publicações científicas, não havendo identificação dos voluntários, a não ser entre os responsáveis pelo estudo, sendo assegurado o sigilo sobre a sua participação. Os dados coletados nesta pesquisa (informações pessoais: nomes e códigos dos participantes), ficarão armazenados em computador do Núcleo de Desenvolvimento Farmacêutico e Cosmético (NUDFAC)/ UFPE e apenas os pesquisadores terão acesso a essas informações, sob a responsabilidade da prof. Leila Bastos Leal, no endereço Av. Prof. Arthur de Sá S/N, Departamento de Ciências Farmacêuticas/ UFPE CEP 50740-520, pelo período de mínimo 5 anos.

Mesmo a aceitação sendo voluntária, será realizado um pagamento de R\$ 10,00 por unha na forma de ressarcimento, ou seja, uma compensação material dos gastos decorrentes da participação na pesquisa, sejam despesas dos participantes e seus acompanhantes entre elas passagem e alimentação, conforme descrito na Resolução N°510, de 07 de abril de 2016. Fica também garantida a indenização em casos de danos, comprovadamente decorrentes da participação na pesquisa, conforme decisão judicial ou extra-judicial.

Em caso de dúvidas relacionadas aos aspectos éticos deste estudo, você poderá consultar o Comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo Seres Humanos da UFPE no endereço: (Avenida da Engenharia s/n – 1º Andar, sala 4 - Cidade Universitária, Recife-PE, CEP: 50740-600, Tel.: (81) 2126.8588 – e-mail: cepccs@ufpe.br).

(assinatura do pesquisador)

CONSENTIMENTO DA PARTICIPAÇÃO DA PESSOA COMO VOLUNTÁRIO (A)

Eu, _____, CPF _____, abaixo assinado, após a leitura (ou a escuta da leitura) deste documento e de ter tido a oportunidade de conversar e ter esclarecido as minhas dúvidas com o pesquisador responsável, concordo em participar do estudo **Coleta e corte de unhas para estudo *ex vivo***, como voluntário (a). Fui devidamente informado (a) e esclarecido (a) pelo(a) pesquisador (a) sobre a pesquisa, os procedimentos nela envolvidos, assim como os possíveis riscos e benefícios decorrentes de minha participação. Foi-me garantido que posso retirar o meu consentimento a qualquer momento, sem que isto leve a qualquer penalidade.

Local e data _____

Assinatura do participante: _____

Impressão
digital
(opcional)

Presenciamos a solicitação de consentimento, esclarecimentos sobre a pesquisa e o aceite do voluntário em participar. (02 testemunhas não ligadas à equipe de pesquisadores):

Nome:	Nome:
Assinatura:	Assinatura:

ANEXO A – PARACER CONSUBSTANCIADO DO CEP (CAAE)



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Melhorando o desempenho de tratamentos tópicos para doenças das unhas: visando a onicomicose, uma necessidade médica não atendida.

Pesquisador: LEILA BASTOS LEAL

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 27554719.1.0000.5208

Instituição Proponente: Universidade Federal de Pernambuco - UFPE

Patrocinador Principal: Academy of Medical Science

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 3.824.438

Apresentação do Projeto:

Trata-se de um projeto de pesquisa a ser realizado pela Profa. Dra. Leila Bastos Leal, pesquisadora responsável, e conta com as pesquisadoras: Juliana Kishishita, Asley Thalia Medeiros Souza, Elayne Karine Souto de Melo, Maria Alice Maciel Tabosa e Julia Celly. O projeto será realizado no Núcleo de Desenvolvimento Farmacêutico e Cosmético do Departamento de Ciências Farmacêuticas da UFPE em parceria com a Universidade Bath/UK.

Objetivo da Pesquisa:

Desenvolver e avaliar a permeação ex vivo através das unhas de formulações contendo antifúngicos não patenteados para tratamento de onicomicoses.

- Desenvolver formulações que garantam a solubilidade e a estabilidade do ativo; que sejam retidas na placa ungueal após a aplicação por tempo suficiente para facilitar a difusão de FA e que, uma vez aplicado na placa ungueal, devem proporcionar liberação sustentada dos ativos e atividade termodinâmica adequada para garantir liberação do fármaco na placa ungueal.
- Cortar e coletar unhas de participantes sadios para serem utilizadas em estudos ex vivo.
- Avaliar a permeação ex vivo através das unhas das formulações desenvolvidas utilizando células de Franz com adaptador de unhas PermeGear;
- Melhorar os métodos atuais e desenvolver novos métodos que permitam avaliar e prever o

Endereço: Av. da Engenharia s/nº - 1º andar, sala 4, Prédio do Centro de Ciências da Saúde
Bairro: Cidade Universitária **CEP:** 50.740-600
UF: PE **Município:** RECIFE
Telefone: (81)2126-8588 **E-mail:** cepccs@ufpe.br