



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

NATALIA RODRIGUES DE OLIVEIRA

**DESENVOLVIMENTO DE FORMULAÇÃO DE ESMALTE
CONTENDO PRINCÍPIOS ATIVOS NATURAIS COMO
ALTERNATIVA NO TRATAMENTO DA ONICOMICOSE**

Londrina
2020

NATALIA RODRIGUES DE OLIVEIRA

**DESENVOLVIMENTO DE FORMULAÇÃO DE ESMALTE
CONTENDO PRINCÍPIOS ATIVOS NATURAIS COMO
ALTERNATIVA NO TRATAMENTO DA ONICOMICOSE**

Dissertação apresentada à Universidade Estadual de Londrina - UEL, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Orientador: Prof^a. Dr^a. Audrey Alesandra Stingham Garcia Lonni

Co-orientador: Prof. Dr. Luciano Aparecido Panagio

Londrina

2020

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UEL

O48d Oliveira, Natalia Rodrigues de.
Desenvolvimento de formulação de esmalte contendo princípios ativos naturais como alternativa no tratamento da onicomicose / Natalia Rodrigues de Oliveira. - Londrina, 2020.
92 f. : il.

Orientador: Audrey Alesandra Stingham Garcia Lonni.
Coorientador: Luciano Aparecido Panagio.
Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências da Saúde, Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, 2020.
Inclui bibliografia.

1. Nanotecnologia - Tese. 2. Óleos essenciais - Tese. 3. Onicomicose - Tese. 4. Esmalte - Tese. I. Lonni, Audrey Alesandra Stingham Garcia . II. Panagio, Luciano Aparecido. III. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências da Saúde. Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas. IV. Título.

CDU 61

NATALIA RODRIGUES DE OLIVEIRA

**DESENVOLVIMENTO DE FORMULAÇÃO DE ESMALTE CONTENDO
PRINCÍPIOS ATIVOS NATURAIS COMO ALTERNATIVA NO
TRATAMENTO DA ONICOMICOSE**

Dissertação apresentada à Universidade Estadual de Londrina - UEL, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

BANCA EXAMINADORA

Prof^a. Dr^a. Audrey Alesandra Stingham Garcia
Lonni
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Prof. Dr. Gerson Nakazato
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Prof^a. Dr^a. Mirela Fulgencio Rabito-Melo
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Londrina, 22 de setembro de 2020.

AGRADECIMENTOS

À Deus por ter me dado a vida e forças para chegar até aqui.

À minha mãe Antonia e ao meu irmão Rogério pela compreensão, paciência e amor incondicionais em todos os momentos desta jornada.

À professora Audrey, não só pela orientação deste trabalho, mas também por toda atenção a mim dedicada em todos estes anos.

Ao professor Luciano pela coorientação deste trabalho e por todo auxílio prestado.

Às amigas Bruna, Mikaela, Clara, Pryscilla, Briani, Karyna e Talita pela parceria e pelos cafezinhos regados a boas conversas. Levarei vocês para sempre no coração.

Aos companheiros do NIP 9 por me ensinarem muito mais do que microbiologia.

Aos companheiros do LABITEF pelo auxílio e amizade oferecidos.

E a todos aqueles que de alguma forma tornaram a realização deste trabalho possível.

“Porque eu, o Senhor, Teu Deus, te tomo pela tua mão
direita e te digo: Não temas, que eu te ajudo.”

Isaías 41:10

OLIVEIRA, Natalia Rodrigues de. **Desenvolvimento de formulação de esmalte contendo princípios ativos naturais como alternativa no tratamento da onicomicose**. 2020. 92 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Centro de Ciências da Saúde, Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2020.

RESUMO

Onicomicose é uma infecção ungueal causada por fungos dermatófitos, não-dermatófitos ou leveduras, acometendo cerca de 25% da população mundial e 11,9% da população brasileira. As terapias oral e tópica são as mais utilizadas no tratamento desta doença e contam com o uso de agentes antifúngicos sintéticos; entretanto, a eficácia delas é limitada por conta de riscos de hepatotoxicidade, interação medicamentosa e efeitos colaterais, além do longo tempo de duração e baixa permeação ungueal. Este trabalho objetivou desenvolver formulações de esmalte, de uso tópico, acrescidas dos Óleos Essenciais de Orégano (OEO) e Alecrim (OEA) e de nanopartículas de prata biogênicas (bio-NPAg) a fim de avaliar a atividade antimicrobiana *in vitro* contra *Trichophyton mentagrophytes*, *Trichophyton rubrum*, *Microsporum canis* e *Microsporum gypseum* como nova alternativa no tratamento da onicomicose. Através de planejamento estatístico, definiram-se 7 formulações de esmalte, que foram posteriormente submetidas a testes antimicrobianos, de estabilidade, de permeação e caracterização farmacotécnica. A citotoxicidade dos ativos foi testada por meio de ensaio de brometo de 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-difenil-2H-tetrazólio (MTT). O teste de disco-difusão mostrou que OEO e a formulação contendo OEO (FOO) apresentaram forte inibição do crescimento fúngico, enquanto que na determinação das concentrações inibitória mínima (CIM) e fungicida mínima (CFM) as bio-NPAg mostraram melhor desempenho, exibindo valores de CIM e CFM da ordem de $10^{-4}\%$. Além disso, o teste de citotoxicidade atestou a segurança dos ativos, permitindo sua incorporação ao produto sem riscos de danos à saúde humana. As formulações apresentaram permeação na placa ungueal, sendo que aquela que continha OEO, OEA e bio-NPAg (FOAAG) mostrou melhor desempenho em relação a este parâmetro. Já as formulações contendo OEO (FOO), OEO com OEA (FOOA) e OEO com bio-NPAg (FOAG) foram as mais eficazes no teste de infecção ungueal, exibindo culturas negativas desde o quinto dia de tratamento. Finalmente, FOO e FOAG foram as formulações escolhidas como potenciais candidatas à formulação final do produto. Estas foram eficazes nos testes *in vitro* e mostraram inibição do crescimento fúngico de acordo com as imagens de microscopia eletrônica de varredura (MEV), além de serem estáveis e apresentarem pH compatível com o da região ungueal (aproximadamente 5,0). Portanto, FOO e FOAG podem ser utilizadas como nova alternativa terapêutica, pois contêm ativos de origem natural, são seguras e eficazes no tratamento da onicomicose.

Palavras-chave: esmalte antifúngico; atividade antimicrobiana; terapia tópica; nanotecnologia; óleos essenciais.

OLIVEIRA, Natalia Rodrigues de. **Development of nail lacquer formulation containing natural active ingredients as an alternative method for onychomycosis treatment.** 2020. 92 p. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Centro de Ciências da Saúde, Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2020.

ABSTRACT

Onychomycosis is a fungal infection caused by dermatophytes, non-dermatophyte fungi or yeasts, affecting about 25% of world's population and 11,9% of Brazilian population. The most common therapeutical approaches used to treat this disease are topical and oral ones and involve synthetical antifungal agents; however, their efficacies are limited due to risks of hepatotoxicity, drug interactions and side effects, in addition to long-term treatment and poor nail permeation. The present study aimed at developing topical nail lacquer formulations containing Oregano (OEO) and Rosemary (REO) Essential Oils and biogenic silver nanoparticles (bio-NPAg) in order to evaluate *in vitro* antifungal activity against *Trichophyton mentagrophytes*, *Trichophyton rubrum*, *Microsporum canis* and *Microsporum gypseum* as new approach for onychomycosis treatment. By statistical design, 7 nail lacquer formulations were developed, which were undergone to antimicrobial, stability, permeation and pharmacotechnical tests. Citotoxicity was assessed by 3-(4,5-dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide (MTT) assay. Disk-diffusion assay showed that OEO and the formulation containing OEO (FOO) strongly inhibited fungal growth, whereas in determining of both minimum inhibitory (MIC) and minimum fungicide concentrations (MFC), bio-NPAg was the bioactive that performed best, showing MIC and MFC values around $10^{-4}\%$. In addition, citotoxicity assay confirmed bioactives's safety, allowing their incorporation to nail lacquer formulation with no risks to human health. Formulations were able to permeate on nail plate and the one containing OEO, OEA and bio-NPAg (FOAAG) performed best regarding this parameter. The ones containing OEO (FOO), OEO plus OEA (FOOA) and OEO plus bio-NPAg (FOAG) were the most effective regarding nail infection assay, showing negative cultures since fifth day of treatment. Finally, FOO and FOAG were the ones chosen as the most likely to be the final nail lacquer formulation. According to *in vitro* tests and scan electron microscopy (SEM) images, they were effective in inhibiting fungal growth, in addition to being stable and presenting a pH value compatible with the one for nail plate (around 5,0). Therefore, FOO and FOAG can be used as new alternative approach, because they contain natural ingredients, are safe and effective for onychomycosis treatment.

Key-words: antifungal nail lacquer; antimicrobial activity; topical therapy; nanotechnology; essential oils.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Anatomia da unidade ungueal, distinguindo suas estruturas: matriz ungueal (1), lúnula (2), cutícula (3), dobra proximal (4), dobras laterais (5), placa ungueal (6), faixa onicodérmica (7), onicólise fisiológica ou unha livre (8), região distal (9), eponíquio (10), hiponíquio (11) e leito ungueal (12).....	21
Figura 2 – Unha acometida por onicomicose superficial clássica, apresentando manchas brancas com borda distinta.....	24
Figura 3 – Unha acometida por onicomicose superficial profunda, com manchas difusas.	24
Figura 4 – Unha infectada com onicomicose subungueal distal e lateral, apresentando descoloração, hiperqueratose e onicólise	25
Figura 5 – Unha infectada com onicomicose subungueal proximal, com mancha branca na região proximal	26
Figura 6 – Unha comprometida com onicomicose <i>endonix</i>	27
Figura 7 – Unha acometida por onicomicose distrófica total	27
Figura 8 – Alvo de atuação dos azóis, alilaminas e morfolinas na rota de síntese do ergosterol	31
Figura 9 – Estrutura química dos antifúngicos: (A) eficonazol, (B) terbinafina, (C) amorolfina, (D) ciclopirox, (E) tavaborol.....	33
Figura 10 – Estruturas químicas de compostos encontrados em óleos essenciais: monoterpenos - limoneno (A), timol (B), 1,8-cineol (C) e geraniol (D), sesquiterpenos – bisabolol (E) e farneseno (F) – e fenilpropanoides – eugenol (G).....	40
Figura 11 – Parte aérea da planta <i>Origanum vulgare</i>	42
Figura 12 – Porção aérea da planta <i>Rosmarinus officinalis</i>	44
Figura 13 – Planejamento Centroide Simples, com modificações, para desenvolvimento das formulações de esmalte contendo os três ativos: OEO, OEA e bio-NPAG	51
Figura 14 – Diagrama esquemático da célula fotoacústica	57
Figura 15 – Diagrama esquemático para o estudo <i>ex vivo</i> da permeação dos esmaltes na estrutura ungueal	58

Figura 16 – Teste de disco-difusão aplicado aos princípios ativos OEO (A), OEA (B) e bio-NPAG (C) frente aos dermatófitos <i>Tricophyton mentagrophytes</i> (1), <i>Tricophyton rubrum</i> (2), <i>Microsporum canis</i> (3) e <i>Microsporum gypseum</i> (4). Cultivos dos respectivos fungos foram usados como controle negativo (D)	60
Figura 17 – Teste de disco-difusão aplicado às formulações FOO, FOA, FAG, FOOA, FAAG, FOAG e FOAAG frente a <i>Tricophyton mentagrophytes</i> , tendo FP como padrão comparativo e CT como controle negativo	65
Figura 18 – Teste de disco-difusão aplicado às formulações FOO, FOA, FAG, FOOA, FAAG, FOAG e FOAAG frente a <i>Tricophyton rubrum</i> , tendo FP como padrão comparativo e CT como controle negativo	66
Figura 19 – Teste de disco-difusão aplicado às formulações FOO, FOA, FAG, FOOA, FAAG, FOAG e FOAAG frente a <i>Microsporum canis</i> , tendo FP como padrão comparativo e CT como controle negativo.....	66
Figura 20 – Teste de disco-difusão aplicado às formulações FOO, FOA, FAG, FOOA, FAAG, FOAG e FOAAG frente a <i>Microsporum gypseum</i> , tendo FP como padrão comparativo e CT como controle negativo	67
Figura 21 – Cultura de fragmentos de unhas infectadas com <i>Tricophyton mentagrophytes</i> e tratadas com todas as formulações durante 5 dias.....	68
Figura 22 – Espectros de absorção FTIR-PAS das formulações FOO, FOA, FAG, FOAAG e FB.....	70
Figura 23 – Espectros de absorção FTIR-PAS da unha sem esmalte (controle) e após 30 minutos de contato com as formulações FB, FOO, FOA, FAG e FOAAG.....	71
Figura 24 – Área sob a curva obtida por meio de integral para as bandas centradas em 1758, 1242 e 1079 cm^{-1} , subtraída a área da unha controle nessa região. Cada valor representa a média \pm E.P.M de 10 unhas por grupo. <i>One-way</i> ANOVA seguido do teste de Tukey, com $p < 0,05$	72

Figura 25 – Imagens de microscopia eletrônica de varredura de unhas infectadas com *Tricophyton mentagrophytes* sem tratamento (I) e tratadas com FOO (II) e FOAG (III) durante 15 dias78

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 – Prevalência da onicomicose em diversas regiões do mundo.....	22
Quadro 2 – Tratamento de unhas infectadas com <i>T. mentagrophytes</i> (TM), <i>Tricophyton rubrum</i> (TR), <i>Microsporum canis</i> (MC) e <i>Microsporum gypseum</i> (MC) com todas as formulações durante 15 dias	69

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1** – Composição de sete formulações de esmalte contendo óleos essenciais de orégano (OEO) e alecrim (OEA) e nanopartículas de prata biogênicas (bio-NPAg) isoladamente e/ou em associação e uma formulação base (FB), que é isenta de ativos52
- Tabela 2** – Valor médio da concentração inibitória mínima \pm desvio padrão dos óleos essenciais de orégano (OEO) e alecrim (OEA) e nanopartículas de prata biogênicas (Bio-NPAg) frente a *T. mentagrophytes*, *T. rubrum*, *M. canis* e *M. gypseum*62
- Tabela 3** – Concentração fungicida mínima (CFM) dos óleos essenciais de orégano (OEO) e alecrim (OEA) e nanopartículas de prata biogênicas (Bio-NPAg) frente a *T. mentagrophytes*, *T. rubrum*, *M. canis* e *M. gypseum*63
- Tabela 4** – Índice de citotoxicidade obtido por meio de ensaio em MTT em linhagem de células VERO para OEO, OEA e bio-NPAg.....64
- Tabela 5** – Valores de pH das formulações FOO, FOAG e FB a 25 °C.75
- Tabela 6** – Valores de densidade relativa \pm desvio padrão das formulações FOO, FOAG e FB a 20 °C.....75
- Tabela 7** – Valores médios \pm desvio padrão dos tempos de secagem das formulações FOO, FOAG e FB.76

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

OEs	Óleos essenciais
BDA	Batata, dextrose e ágar
Bio-NPAg	Nanopartículas de prata biogênicas
FAG	Formulação contendo nanopartículas de prata
FAAG	Formulação contendo óleo essencial de alecrim e nanopartículas de prata
FB	Formulação base isenta de ativos
FOA	Formulação contendo óleo essencial de alecrim
FOAAG	Formulação contendo óleo essencial de orégano e de alecrim e nanopartículas de prata
FOAG	Formulação contendo óleo essencial de orégano e nanopartículas de prata
FOO	Formulação contendo óleo essencial de orégano
FOOA	Formulação contendo óleo essencial de orégano e de alecrim
FP	Formulação padrão contendo cloridrato de amorolfina 5%®
MEV	Microscopia eletrônica de varredura
NPAg	Nanopartículas de prata
OEA	Óleo essencial de alecrim
OEO	Óleo essencial de orégano

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	18
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	20
2.1	UNHA	20
2.2	ONICOMICOSE.....	21
2.2.1	Etiologia.....	21
2.2.2	Epidemiologia.....	22
2.2.3	Formas Clínicas de Onicomicose.....	23
2.2.3.1	Onicomicose superficial (OS).....	23
2.2.3.2	Onicomicose subungueal distal e lateral (OSDL)	25
2.2.3.3	Onicomicose subungueal proximal (OSP).....	25
2.2.3.4	Onicomicose <i>endonyx</i> (OE).....	26
2.2.3.5	Onicomicose distrófica total (ODT).....	27
2.2.4	Diagnóstico.....	28
2.2.4.1	Cultura fúngica	28
2.2.4.2	Microscopia direta	28
2.2.4.3	Avaliação histopatológica	29
2.2.4.4	Análise molecular	30
2.2.5	Tratamento	30
2.2.5.1	Mecanismo de ação dos agentes antifúngicos.....	31
2.2.5.2	Avulsão e desbridamento da unha	34
2.2.5.3	Terapia oral	34
2.2.5.4	Terapia tópica.....	36

2.2.5.5	Terapias biofísicas.....	37
2.3	ÓLEOS ESSENCIAIS.....	39
2.3.1	Óleo Essencial de Orégano (<i>Origanum vulgare L.</i>).....	42
2.3.2	Óleo Essencial de Alecrim (<i>Rosmarinus officinalis L.</i>)	43
2.4	NANOPARTÍCULAS DE PRATA.....	45
2.4.1	Mecanismo de ação	45
2.4.2	Métodos de síntese	46
2.4.2.1	Método físico	46
2.4.2.2	Método químico	46
2.4.2.3	Método biológico	47
3	OBJETIVOS	49
3.1	OBJETIVO GERAL.....	49
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	49
4	MATERIAIS E MÉTODOS	50
4.1	OBTENÇÃO DOS PRINCÍPIOS ATIVOS	50
4.2	DESENVOLVIMENTO DAS FORMULAÇÕES DE ESMALTE	50
4.3	CARACTERIZAÇÃO FARMACOTÉCNICA.....	52
4.3.1	Análise de Pré-estabilidade.....	52
4.3.2	Análise Organoléptica	52
4.3.3	Análises Físico-químicas.....	53
4.3.3.1	Determinação do pH.....	53
4.3.3.2	Densidade	53

4.3.3.3	Tempo de secagem.....	54
4.4	ENSAIOS ANTIMICROBIANOS.....	54
4.4.1	Obtenção e Cultivo dos Microrganismos.....	54
4.4.2	Teste de Disco-difusão.....	54
4.4.3	Teste de Microdiluição em Caldo.....	55
4.4.4	Teste da Concentração Fungicida Mínima (CFM).....	55
4.4.5	Teste de Infecção Ungueal.....	55
4.4.5.1	Obtenção das amostras de unha.....	55
4.4.5.2	Infecção ungueal.....	56
4.5	AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE.....	56
4.6	AVALIAÇÃO DA PERMEAÇÃO DAS FORMULAÇÕES NA UNHA.....	56
4.6.1	Espectroscopia Fotoacústica no Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR-PAS).....	56
4.6.2	Análise da Permeação dos Esmaltes na Unha.....	56
4.6.3	Análise Estatística.....	58
4.7	AVALIAÇÃO DA ESTABILIDADE PRELIMINAR.....	59
4.8	MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA.....	59
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	60
5.1	TESTES REALIZADOS COM OS PRINCÍPIOS ATIVOS.....	60
5.1.1	Teste de Disco-difusão.....	60
5.1.2	Determinação das Concentrações Inibitória Mínima (CIM) e Fungicida Mínima (CFM).....	61
5.1.3	Avaliação da Citotoxicidade.....	64
5.2	TESTES REALIZADOS COM AS FORMULAÇÕES DE ESMALTE....	65
5.2.1	Teste de Disco-difusão.....	65

5.2.2	Teste de Infecção Ungueal.....	67
5.2.3	Avaliação da Permeação das Formulações na Unha.....	70
5.3	SELEÇÃO DAS FORMULAÇÕES DE ESMALTE	73
5.4	CARACTERIZAÇÃO FARMACOTÉCNICA DAS FORMULAÇÕES SELECIONADAS.....	74
5.4.1	Teste de Centrifugação	74
5.4.2	Ensaio Organoléptico.....	74
5.4.3	Ensaio Físico-químico.....	75
5.4.3.1	Determinação do pH.....	75
5.4.3.2	Avaliação da densidade	75
5.4.3.3	Análise do tempo de secagem	76
5.5	AVALIAÇÃO DA ESTABILIDADE PRELIMINAR.....	76
5.6	MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA.....	77
6	CONCLUSÃO	79
	REFERÊNCIAS.....	80
	ANEXOS	90
	ANEXO A - Laudo técnico do óleo essencial de orégano	91
	ANEXO B - Laudo técnico do óleo essencial de alecrim	92

1 INTRODUÇÃO

A unha é caracterizada como um anexo cutâneo rígido e queratinizado, responsável por proteger as extremidades dos dedos das mãos e pés. Pode ser acometida por diversas onicopatias, dentre as quais está a onicomicose (BENSON et al., 2019; LAUBÉ et al., 2019; MADDY, TOSTI, 2018; NAKAMURA, BARAN, 2018).

De alta prevalência mundial, a onicomicose é uma infecção de origem fúngica que acomete sobretudo as unhas dos pés, tendo *Tricophyton rubrum* como principal agente etiológico. O patógeno pode contaminar a unidade ungueal através da placa ou ainda das dobras laterais, proximal e hiponíquio e então, a unha infectada passa a apresentar aspecto distrófico, manifestando sinais como mudança de coloração, onicólise e hiperqueratose subungueal, além de causar dor e incômodo ao indivíduo (BASWAN et al., 2017; BODMAN, KRISHNAMURTHY, 2019; EL GENDY, SEDDEK, MOHAMMED, 2016; TOSTI, VLAHOVIC, ARENAS, 2017).

Somado ao desconforto físico, é importante ressaltar o forte impacto psicológico decorrente desta patologia, pois o aspecto inestético das unhas adoecidas passa a afetar a autoestima do indivíduo, gerando nele sentimentos de constrangimento, angústia e até mesmo levando-o ao isolamento social, portanto, prejudicando profundamente sua qualidade de vida. Sendo assim, recorre-se ao uso de terapias antifúngicas para tratamento da referida patologia (TOSTI, VLAHOVIC, ARENAS, 2017).

Dentre as diversas alternativas disponíveis, as terapias tópica e oral são as mais utilizadas no tratamento da onicomicose, contando com agentes antifúngicos, em sua maioria sintéticos e de ação fungistática, como os azóis, tavaborol, terbinafina, amorolfina e ciclopirox. Contudo, a eficácia da terapia oral é limitada por fatores como a resistência microbiana ao fármaco, potencial hepatotoxicidade, múltiplos efeitos colaterais e risco de interação medicamentosa, e no caso de terapia tópica, o longo tempo de tratamento e a baixa permeação do fármaco na placa ungueal. Neste sentido, faz-se necessária a constante busca por ativos naturais e seguros para contornar tais entraves (CAMPOY, ADRIO, 2017; DEL ROSSO, 2014; GUPTA, PAQUET, SIMPSON, 2013; LOPES, PINTO, SALGUEIRO, 2017; ROSEN, STEIN GOLD, 2016).

Óleos essenciais são líquidos voláteis de natureza lipofílica oriundos de plantas, cuja composição conta com uma mistura principalmente de compostos

terpenoides. Apresentam propriedades anti-inflamatória, antioxidante, analgésica e antimicrobiana e, por conta delas, são amplamente aplicados nos setores farmacêutico, sanitário, alimentício e cosmético. Podem ser considerados bioativos inócuos devido à origem natural, constituindo-se uma possível alternativa terapêutica no tratamento da onicomicose. Como exemplos, têm-se os óleos de orégano, melaleuca, alecrim, eucalipto e citronela (BARBIERI, BORSOTTO, 2018; LOPES, PINTO, SALGUEIRO, 2017; NAZZARO et al., 2017; SWAMY, AKHTAR, SINNIHAH, 2016).

O óleo essencial de orégano é principalmente constituído por timol e carvacrol, enquanto o óleo essencial de alecrim contém 1,8-cineol, cânfora e α -pineno. Sabe-se que a atividade antimicrobiana de ambos está relacionada à composição, sobretudo à presença de compostos fenólicos, que os torna eficazes contra uma ampla gama de bactérias, fungos filamentosos e leveduras (CUI, 2019; NIETO, ROS, CASTILLO, 2018; SWAMY, AKHTAR, SINNIHAH, 2016).

A nanotecnologia tem constantemente contribuído com o desenvolvimento de compostos antifúngicos, a exemplo das nanopartículas de prata. Sua síntese é simples e de baixo custo e pode ser realizada através de técnicas físicas, químicas ou biológicas. Possuem atividade antimicrobiana devido à liberação de íons de prata a partir de sua superfície, sendo eficazes contra diversos patógenos fúngicos e bacterianos. Encontram aplicações nos setores de saúde, alimentício, têxtil, farmacêutico, sanitário e cosmético, podendo ser incorporadas a produtos para cuidados com as unhas (AHMAD et al., 2019; BOCATE et al., 2019; IRAVANI et al., 2014; PRABHU, POULOSE, 2012; SHARMA et al., 2018; TRAN, NGUYEN, LE, 2018).

Considerando as limitações inerentes às terapias tópica e oral, bem como a potencial nocividade dos agentes antifúngicos à saúde humana, o desenvolvimento de uma formulação tópica de esmalte contendo ativos de origem natural visa estabelecer uma nova alternativa terapêutica, igualmente eficaz e mais segura que as comercialmente existentes, no tratamento da onicomicose.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 UNHA

Trata-se de um importante anexo cutâneo translúcido, levemente convexo e semirrígido que recobre a extremidade dorsal dos dedos das mãos e pés. Responsável pela proteção das falanges, também contribui para a sensibilidade tátil e mecânica, auxiliando nos atos de coçar ou arranhar e na manipulação de pequenos objetos, além da função estética, desempenhando papel de adorno (BASWAN et al., 2017; LAUBÉ et al., 2019; NAKAMURA, BARAN, 2018).

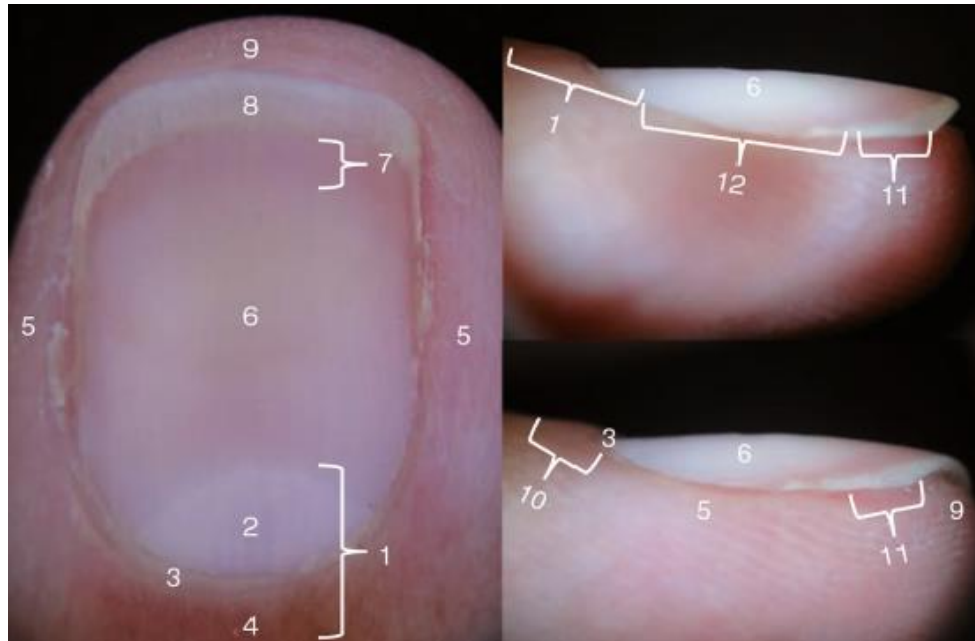
Constituída principalmente por queratina, conta com significativa porção de enxofre (em torno de 10%) atribuída à presença do aminoácido cisteína. Ao contrário da pele, com cerca de 10 % de lipídeos, seu teor lipídico varia entre 0,1 e 1,0%, presente principalmente na forma de colesterol. A água, presente em torno de 18%, atua como plastificante da estrutura e sua porcentagem depende da umidade relativa do ambiente. Também possui quantidades variáveis de minerais como ferro, cálcio, sódio, magnésio, cobre, zinco, potássio e selênio (BASWAN et al., 2017; BENSON et al., 2019).

Sendo um anexo dinâmico, a unha apresenta crescimento médio de 3 mm/mês nas mãos e de 1 mm/mês nos pés, levando, respectivamente, cerca de 6 meses e entre 12 a 18 meses para crescimento completo. Tal crescimento pode ser influenciado pelo clima, estilo de vida e condição de saúde do indivíduo, sendo mais rápido na mão dominante, em homens, na gravidez, em unhas roídas e em climas quentes e mais lento em idosos, lactantes, pessoas imunocomprometidas, desnutridas, com infecções ou que façam tratamento com medicamentos antimetabólicos (BASWAN et al., 2017; NAKAMURA, BARAN, 2018).

O desenvolvimento da unidade ungueal se dá entre a 9^a e 17^a semanas de gestação e anatomicamente é composta por estruturas como: matriz, leito, placa e dobras ungueais. A matriz é responsável pela geração da placa ungueal e sua porção visível é denominada de lúnula. O leito ungueal é um epitélio disposto na forma de cristas longitudinais e une-se fortemente à placa ungueal, que sobre ele cresce paralelamente. Quanto às dobras ungueais, estas são divididas em: laterais, proximal, em cuja porção distal está a cutícula (eponíquio) e sulco distal (denominado

hiponíquio) que compreende uma porção de forte aderência ao leito: a faixa onicodérmica, conforme Figura 1 (BENSON et al., 2019; NAKAMURA, BARAN, 2018).

Figura 1 – Anatomia da unidade ungueal, distinguindo suas estruturas: matriz ungueal (1), lúnula (2), cutícula (3), dobra proximal (4), dobras laterais (5), placa ungueal (6), faixa onicodérmica (7), onicólise fisiológica ou unha livre (8), região distal (9), eponíquio (10), hiponíquio (11) e leito ungueal (12).



Fonte: Nakamura, Baran (2018)

2.2 ONICOMICOSE

É o termo empregado para designar infecções na unidade ungueal, causadas por fungos dermatófitos, não-dermatófitos ou leveduras. Pode acometer tanto as unhas das mãos, quanto as dos pés, sendo as últimas cerca de 25 vezes mais susceptíveis à doença devido ao ambiente oclusivo proporcionado pelo calçado (BASWAN et al., 2017; TOSTI, VLAHOVIC, ARENAS, 2017).

2.2.1 Etiologia

Comumente, a doença é originada por fungos dermatófitos, dentre os quais se destacam *Tricophyton rubrum*, *Tricophyton mentagrophytes* e *Epidermophyton floccosum*, que juntos respondem por cerca de 90% dos casos. Com prevalência

aproximada de 8%, aparecem os casos envolvendo fungos não-dermatófitos, tendo como agentes etiológicos mais comuns espécies de *Fusarium*, *Aspergillus*, *Acremonium*, *Scytalidium* e *Scopulariopsis brevicaulis*. Por fim, as leveduras são responsáveis por 2% das ocorrências, tendo *Candida albicans* como principal patógeno (BODMAN, KRISHNAMURTHY, 2019; TOSTI, VLAHOVIC, ARENAS, 2017).

2.2.2 Epidemiologia

A onicomicose responde por cerca de 50% das onicopatias conhecidas e acomete entre 20 e 25% da população mundial, variando de acordo com a localidade, conforme o Quadro 1. No Brasil, a prevalência estimada é de 11,9% (EL GENDY, SEDDEK, MOHAMMED, 2016; GUPTA, VERSTEEG, SHEAR, 2017).

Quadro 1 - Prevalência da onicomicose em diversas regiões do mundo.

Local	Prevalência estimada	Referência
Estados Unidos	2-26%	Tosti, Vlahovic, Arenas (2017)
América do Norte	14%	Dubljanin et al. (2017)
Europa	26,8%	Dubljanin et al. (2017)
Grécia	16,5%	Maraki, Mavromanolaki (2016)
Sérvia	50,8%	Dubljanin et al. (2017)
Índia	50,6%	Satpathi et al. (2016)
Etiópia	60,4%	Bitew, Wolde (2019)
Israel	80%	Segal et al. (2015)
Japão	2,4%	Noguchi et al. (2020)

A taxa de prevalência depende de fatores relacionados ao estilo de vida do indivíduo, bem como à sua condição de saúde e ambiente em que vive. Idade, sexo, profissão, convivência com pessoas infectadas, histórico familiar, imunossupressão e presença de comorbidades (HIV, diabetes, câncer, *tinea*, problemas vasculares), prática de atividade física, tabagismo, obesidade, hábitos de higiene precários e condições ambientais (climas quentes, úmidos e com presença do patógeno) são fatores predisponentes à doença (BASWAN et al., 2017; TOSTI, VLAHOVIC, ARENAS, 2017).

De fato, a idade é o principal fator para desenvolvimento da onicomicose, pois enquanto que em crianças observa-se uma porcentagem entre 0,44 e 0,6%, em indivíduos adultos, esta chega em torno de 20% e acima de 60 anos, aproxima-se dos 50%. Os motivos que justificam a maior incidência na população idosa são: pobre circulação periférica, repetidos traumas na unha, resposta imune suprimida, crescimento lento das unhas, maior área superficial ungueal, grande incidência de *tinea pedis* e inabilidade em manter uma higiene podal adequada (BASWAN et al., 2017; TOSTI, VLAHOVIC, ARENAS, 2017).

2.2.3 Formas Clínicas de Onicomicose

Clinicamente, reconhecem-se cinco padrões de onicomicose, que são: onicomicose superficial (OS), onicomicose subungueal distal e lateral (OSDL), onicomicose subungueal proximal (OSP), onicomicose *endonyx* (EO) e onicomicose distrófica total (ODT). Contudo, há possibilidade de associação entre estes vários padrões, caracterizando assim um padrão misto de onicomicose (TOSTI, VLAHOVIC, ARENAS, 2017).

2.2.3.1 Onicomicose superficial (OS)

Consiste na invasão direta do dorso da placa ungueal pelo patógeno. Forma clínica de baixa prevalência (1,5 a 7,0% dos casos de onicomicose), apresenta-se sob dois principais subtipos: OS clássica e OS profunda. No primeiro, o agente etiológico é um dermatófito, geralmente *Tricophyton mentagrophytes* var. *interdigitale*, que coloniza superficialmente a camada dorsal da placa, conferindo-lhe manchas brancas, opacas e com bordas distintas (Figura 2). Já o segundo subtipo é ocasionado por fungos não-dermatófitos, como *Aspergillus terreus* e *Fusarium oxysporum*, que são

capazes de penetrar as camadas mais profundas da placa ungueal, provocando manchas difusas de coloração amarelada ou marrom (Figura 3). Não é incomum a combinação entre esta e outras formas clínicas, como OSDL e OSP, por exemplo (BASWAN et al., 2017; TOSTI, VLAHOVIC, ARENAS, 2017).

Figura 2 – Unha acometida por onicomicose superficial clássica, apresentando manchas brancas com borda distinta.



Fonte: Piraccini, Alessandrini (2015)

Figura 3 – Unha acometida por onicomicose superficial profunda, com manchas difusas.



Fonte: Tosti, Vlahovic, Arenas (2017)

2.2.3.2 Onicomicose subungueal distal e lateral (OSDL)

Forma mais comum de onicomicose (mais de 85% dos casos), geralmente é causada por dermatófitos do gênero *Tricophyton*. Inicialmente, o fungo coloniza a região palmo-plantar, causando *tinea manuum* ou *tinea pedis*, e posteriormente espalha-se pela pele em direção ao hiponíquio e dobras laterais, por onde atinge o leito ungueal. Progressivamente, a camada córnea do leito sofre hiperqueratose e esta, por sua vez, acaba empurrando a unha, podendo gerar o descolamento da mesma (onicólise), conforme Figura 4. A placa ungueal normalmente sofre descoloração, tornando-se esbranquiçada, amarelada ou ainda com pigmentação escura, esta última, porém, em casos raros de infecção por fungos não-dermatófitos. Pode causar desconforto e dor ao indivíduo e caso o quadro evolua, celulite e até mesmo onicomicose distrófica total (BASWAN et al., 2017; TOSTI, VLAHOVIC, ARENAS, 2017).

Figura 4 – Unha infectada com onicomicose subungueal distal e lateral, apresentando descoloração, hiperqueratose e onicólise.



Fonte: Piraccini, Alessandrini (2015)

2.2.3.3 Onicomicose subungueal proximal (OSP)

Neste tipo de onicomicose, a camada córnea da dobra proximal é atacada pelo fungo que, via cutícula, infecta a matriz e o ventre da placa ungueal. Assim, o patógeno é incorporado à unha e a infecção migra distalmente à medida em que ocorre seu crescimento. Clinicamente, tal infecção caracteriza-se pelo surgimento de mancha

esbranquiçada na região proximal, hiperqueratose subungueal e até mesmo onicólise (Figura 5).

A doença é especialmente causada por fungos dos gêneros *Aspergillus* e *Fusarium*, caso em que se associa uma inflamação periungueal aguda (paroníquia), podendo gerar dor e desconforto ao indivíduo. Casos envolvendo dermatófitos são raros e tendem a ocorrer com pacientes imunossuprimidos - nesta situação há ausência de paroníquia (PIRACCINI, ALESSANDRINI, 2015; TOSTI, VLAHOVIC, ARENAS, 2017).

Figura 5 - Unha infectada com onicomicose subungueal proximal, com mancha branca na região proximal.



Fonte: Tosti, Vlahovic, Arenas (2017)

2.2.3.4 Onicomicose *endonyx* (EO)

Forma rara da doença, também se caracteriza pelo ataque direto da placa ungueal; neste caso, porém, são atingidas camadas mais profundas da unha. O microrganismo fica restrito à placa, não atingindo o leito ou as dobras e assim, não há manifestação de sinais como hiperqueratose subungueal, descamação, espessamento, onicólise ou inflamação peringueal. O que se observa é a descoloração da unha, que ganha aspecto leitoso, mas que permanece fortemente aderida ao leito (Figura 6). Os principais patógenos envolvidos são *T. violaceum*, *T. soudanense* e *T. rubrum* (PIRACCINI, ALESSANDRINI, 2015; TOSTI, VLAHOVIC, ARENAS, 2017).

Figura 6 – Unha comprometida com onicomicose *endonix*.



Fonte: Piraccini, Alessandrini (2015)

2.2.3.5 Onicomicose distrófica total (ODT)

É o termo utilizado para designar o estágio mais avançado e severo de qualquer um dos tipos de onicomicose anteriormente descritos. Neste caso, a unha assume aspecto distrófico, tornando-se amarelada, espessa, quebradiça e totalmente desfigurada, com alto risco de surgimento de ulcerações subungueais, infecção bacteriana e até mesmo gangrena, conforme Figura 7 (MYRON, 2013; PIRACCINI, ALESSANDRINI, 2015; TOSTI, VLAHOVIC, ARENAS, 2017).

Figura 7 – Unha acometida por onicomicose distrófica total.



Fonte: Piraccini, Alessandrini (2015)

2.2.4 Diagnóstico

O exame clínico da unidade ungueal é insuficiente para confirmar o tipo de infecção que a acometeu bem como sua etiologia. Neste sentido, recorre-se ao diagnóstico laboratorial para que se possa receitar um tratamento adequado ao paciente, evitando danos à sua saúde e garantindo eficácia terapêutica. As formas mais comuns de diagnóstico se dão por meio de microscopia direta, cultura fúngica, histopatologia e mais recentemente, reação em cadeia da polimerase (PCR), sendo muito comum a combinação entre as mesmas a fim de diminuir o risco de vieses na análise (BEUSCHER, KELECHI, 2019; GUPTA, VERSTEEG, SHEAR, 2017).

2.2.4.1 Cultura fúngica

O diagnóstico por cultura é um método comumente utilizado que permite a identificação do agente causador da infecção. Inicialmente, faz-se a coleta de fragmentos de unha e raspas subungueais infectados e então o material é incubado sob condições adequadas ao crescimento do microrganismo. O cultivo ocorre em tubos ou placas de Petri contendo meio de ágar dextrose Sabouraud (ADS), geralmente acrescido de cloranfenicol e cicloheximida (opcional) para evitar o crescimento de bactérias e fungos não-dermatófitos, respectivamente, e a incubação se dá entre 25 e 30 °C por até 1 mês. O resultado é considerado negativo após 3 a 5 semanas, porém, recomenda-se a repetição do exame para evitar um resultado falso-negativo (GUPTA, VERSTEEG, SHEAR, 2017; LIPNER, SCHER, 2019; SILVA, 2017).

Além da demora do resultado, a alta taxa de falso-negativo (cerca de 35%) é também uma desvantagem do teste, sendo esta atribuída a variações na utilização da metodologia, tratamentos prévios inconclusos da infecção e aplicação de agentes antissépticos na amostra, como acetona ou álcool, antes da realização do teste (GUPTA, VERSTEEG, SHEAR, 2017).

2.2.4.2 Microscopia direta

Neste tipo de exame, como o próprio nome sugere, a amostra é diretamente submetida ao exame microscópico para verificação da presença de elementos fúngicos, como hifas septadas, pseudo-hifas, esporos ou dermatofitomas (um amontoado de filamentos e esporos). Para facilitar a detecção do patógeno, recorre-

se ao uso de corantes, como *chlorazol black* e *calcofluor white*, bem como de solução alcalina, geralmente hidróxido de potássio, a fim de clarificar a amostra (GUPTA, VERSTEEG, SHEAR, 2017; LIPNER, SCHER, 2019; WELSH O., VERA-CABRERA, WELSH E., 2010).

A análise é facilmente executada em questão de minutos, porém apresenta menor sensibilidade (48%) em relação a outros métodos como cultura (53%) e histopatologia (82%). Daí recomenda-se a associação, provocando aumento da sensibilidade em mais de 70% (GUPTA, VERSTEEG, SHEAR, 2017).

A taxa de falso-negativo aproxima-se dos 20% e é comumente atribuída à falta de *expertise* do analista. Também é possível a incidência de bolhas de ar e partículas lipídicas, que podem mimetizar estruturas fúngicas e resultar em um falso-positivo (GUPTA, VERSTEEG, SHEAR, 2017; LIPNER, SCHER, 2019).

2.2.4.3 Avaliação histopatológica

Tal diagnóstico recorre ao uso de técnicas de coloração da amostra para viabilizar a visualização de estruturas fúngicas microscopicamente, porém não possibilitando a identificação do patógeno. O exame é relativamente rápido, podendo ser feito em um dia, e mais sensível quando comparado aos métodos de cultura e microscopia. Inicialmente, a amostra é submetida a um tratamento prévio à observação microscópica, necessitando ser fixada, amolecida, desidratada, embebida em parafina e seccionada, e então está apta a ser corada. Múltiplas são as técnicas de coloração, porém as mais populares são aquelas com hematoxilina e eosina, com ácido periódico de Schiff (PAS) e a coloração de metenamina de prata de Grocott (GUPTA, VERSTEEG, SHEAR, 2017; LIPNER, SCHER, 2019).

A hematoxilina é um corante catiônico de caráter básico, sendo assim, reage com elementos celulares de caráter ácido, como os ácidos nucleicos (DNA e RNA), resultando em uma coloração azul. Já a eosina é de natureza aniônica e apresenta caráter oposto, reagindo com os elementos básicos e pigmentando-os com a cor rosa. Da aplicação dos corantes à amostra, pode-se observar um núcleo celular azul e citoplasma rosa (CHAN, 2014).

A técnica com ácido periódico de Schiff (PAS - do inglês *periodic acid-Schiff*) funciona pela exposição do tecido ao ácido periódico, que oxida os grupos hidroxila

presentes nos polissacarídeos da parede celular fúngica a aldeídos. Estes, por sua vez, reagem com o reativo de Schiff, conferindo assim uma coloração magenta ao microrganismo, com fundo levemente rosado (GUPTA, VERSTEEG, SHEAR, 2017; LIPNER, SCHER, 2019).

Já na coloração de metenamina de prata de Grocott, o ácido crômico é o responsável por oxidar os mesmos grupamentos hidroxila a aldeídos, que então reagem com uma mistura de metenamina e nitrato de prata, ocasionando a redução da prata à forma metálica, resultando na pigmentação marrom escura das hifas ou esporos, com fundo verde claro (GUPTA, VERSTEEG, SHEAR, 2017; LIPNER, SCHER, 2019).

2.2.4.4 Análise molecular

A reação em cadeia da polimerase (PCR – do inglês *Polymerase Chain Reaction*) é um método que vem sendo incorporado às formas de diagnóstico da onicomicose e é capaz de identificar o microrganismo por meio da amplificação de uma porção de interesse do seu DNA usando *primers* específicos. Apresenta alta sensibilidade (95%) e o resultado pode ser obtido em até 48 horas; entretanto apresenta alto custo e não permite a determinação de várias espécies simultaneamente (GUPTA, VERSTEEG, SHEAR, 2017; LIPNER, SCHER, 2019).

2.2.5 Tratamento

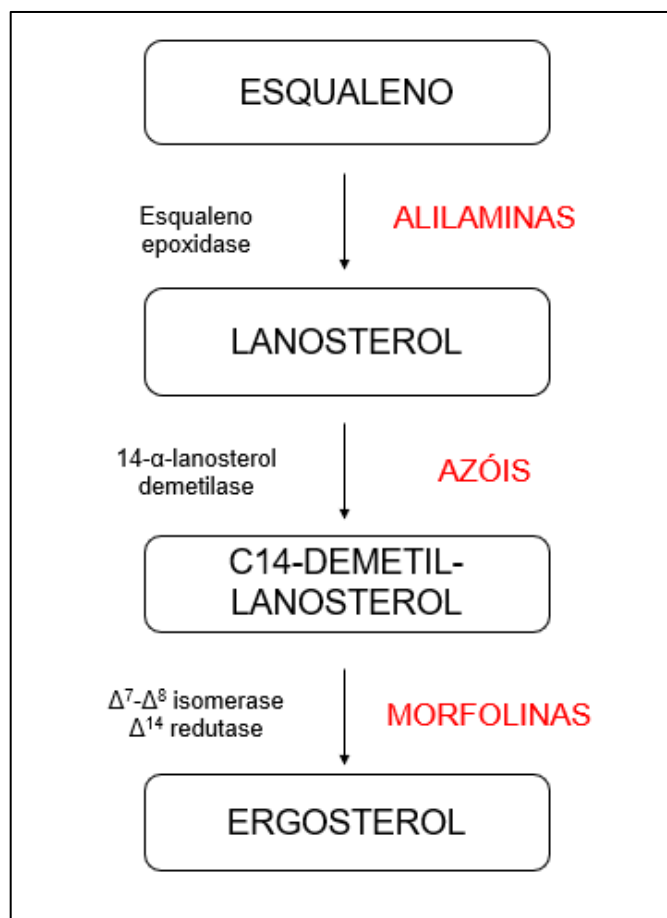
O tratamento da onicomicose mostra-se desafiador, pois há casos em que o paciente não responde à terapia prescrita e somado a isso, é comum a reincidência da doença. As opções de tratamento vigentes incluem o uso de agentes tópicos ou sistêmicos, *lasers* ou ainda a remoção da unha, sendo que a escolha deverá levar em conta fatores como a susceptibilidade do patógeno ao fármaco, efeitos colaterais, potencial de interação com outros medicamentos, idade e condição de saúde do paciente, adesão ao tratamento, custo e grau de severidade da infecção (GUPTA, PAQUET, SIMPSON, 2013; ROSEN, STEIN GOLD, 2016; WELSH O., VERA-CABRERA, WELSH E., 2010).

2.2.5.1 Mecanismo de ação dos agentes antifúngicos

Os antifúngicos atuam por meio de diversos mecanismos, geralmente inibindo a síntese de componentes celulares do microrganismo (parede e membrana celular, ácidos nucleicos, proteínas). Os fármacos mais empregados neste tipo de tratamento incluem as classes dos azóis, alilaminas e morfolininas. O ciclopirox e o tavaborol também são alternativas, sendo o último mais recentemente aprovado para este fim. Podem ser utilizados de forma tópica ou oral, tendo ação fungicida (maioria), fungistática ou mista (CAMPOY, ADRIO, 2017; TOSTI, VLAHOVIC, ARENAS, 2017).

Compostos pertencentes às classes dos azóis, alilaminas e morfolininas são responsáveis pela inibição da síntese de ergosterol (principal constituinte da membrana celular fúngica). Contudo, esta inibição ocorre por mecanismos diferentes, já que cada classe atua em diferentes alvos da rota biossintética do ergosterol, conforme Figura 8 (CAMPOY, ADRIO, 2017).

Figura 8 – Alvo de atuação dos azóis, alilaminas e morfolininas na rota de síntese do ergosterol.



Fonte: Adaptado de Campoy, Adrio (2017)

Os azóis constituem a família de antifúngicos sintéticos mais comumente usada no tratamento de infecções fúngicas, sistêmicas ou tópicas, por apresentarem um amplo espectro de ação. Com ação fungistática, são responsáveis por inibir a enzima 14- α -lanosterol demetilase, dependente do citocromo P450, impedindo a conversão de lanosterol em ergosterol e, conseqüentemente, a replicação do patógeno. Entretanto, visto que os mamíferos também possuem enzimas dependentes deste citocromo, o antifúngico pode atuar sobre elas, e então, comprometer funções metabólicas do indivíduo (CAMPOY, ADRIO, 2017; ELIAS et al., 2019; ROSEN, STEIN GOLD, 2016).

A primeira geração de azóis a ser desenvolvida foi a dos imidazóis (clotrimazol, cetoconazol e miconazol), porém, como estes comprometiam funções gastrointestinais, renais e hepáticas, além de ocasionar interações medicamentosas e irritação cutânea, foram substituídos por outra classe, a dos triazóis (fluconazol, itraconazol e eficonazol (Figura 9A)). Ainda posteriormente, desenvolveu-se uma segunda geração de triazóis, como voriconazol, ravuconazol e posaconazol, que são menos tóxicos e com maior espectro antimicrobiano (CAMPOY, ADRIO, 2017; ELIAS et al., 2019; GIAVINI, MENEGOLA, 2010).

As alilaminas são compostos fungicidas que atuam como inibidores não-competitivos da esqualeno epoxidase, enzima que em conjunto com (2,3)-oxidosqualeno ciclase, é responsável pela conversão do esqualeno em lanosterol. Os principais compostos desta classe são a terbinafina (Figura 9B) e a naftifina (CAMPOY, ADRIO, 2017; MAZU et al., 2016).

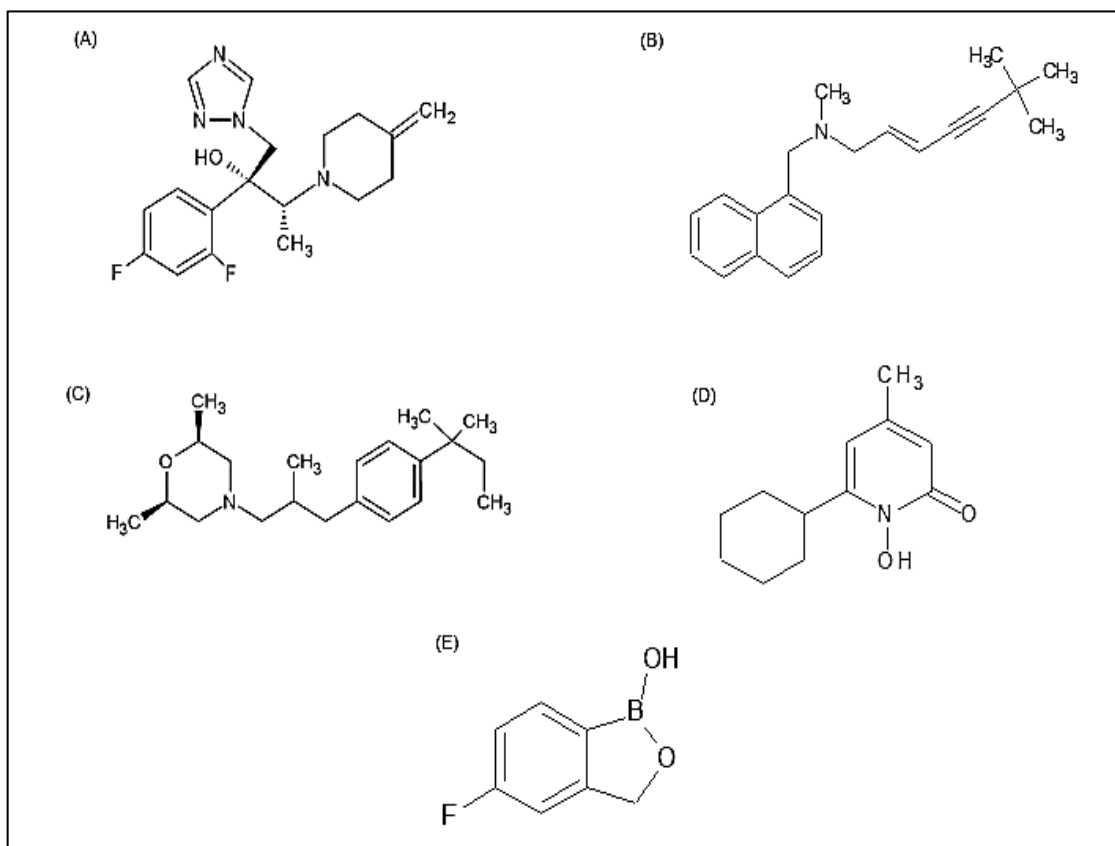
A amorolfina (Figura 9C) é pertencente à classe das morfolinas, sendo o único composto de uso clínico. Provoca a depleção do ergosterol por conta da inibição de duas enzimas: Δ^7 - Δ^8 -isomerase e Δ^{14} -redutase. De origem sintética, tem ação tanto fungicida quanto fungistática *in vitro* (CAMPOY, ADRIO, 2017; MAZU et al., 2016).

O ciclopirox (Figura 9D) é um composto fungicida derivado de hidroxipiridona, cujo mecanismo de ação é múltiplo e difere totalmente dos acima citados. Atua na célula fúngica por meio da quelação de cátions metálicos, como Fe^{3+} e Al^{3+} , comprometendo a função das enzimas dependentes destes íons (citocromos, catalases, peroxidases) e conseqüentemente ocasionando a interrupção de processos celulares como produção de energia, síntese proteica e de ácidos nucleicos e obtenção de nutrientes via membrana, uma vez que altera sua permeabilidade

(GUPTA, PAQUET, SIMPSON, 2013; MAZU et al., 2016; SONTHALIA, AGRAWAL, SEHGAL, 2019).

O tavaborol (Figura 9E), é um composto derivado de oxaborol de uso tópico que atua interferindo na síntese de proteínas por meio da inibição da atividade da enzima leucil-tRNA sintetase, fundamental à síntese proteica na célula fúngica (CAMPOY, ADRIO, 2017).

Figura 9 – Estrutura química dos antifúngicos: (A) eficonazol, (B) terbinafina, (C) amorolfina, (D) ciclopirox, (E) tavaborol.



Visto que os fungos parasitam hospedeiros também eucariotos, as diferenças entre suas células são mínimas, assim, o agente antifúngico pode acabar atuando sobre alvos moleculares da célula humana, ao invés da célula do parasita, prejudicando a saúde do indivíduo. Com isso, surge a constante necessidade de desenvolver compostos cada vez mais específicos para as células fúngicas (CAMPOY, ADRIO, 2017).

2.2.5.2 Avulsão e desbridamento da unha

A avulsão consiste na remoção parcial ou total da unha infectada. Tal procedimento visa à separação da placa ungueal do tecido circundante de forma química pela aplicação de pomadas à base de agentes queratolíticos (como ureia e ácido salicílico) por cerca de 2 semanas, ou de forma cirúrgica com anestesia local, sendo recomendada para casos crônicos, com comprometimento de poucas unhas (até 3) ou inviabilidade do uso das terapias alternativas. A avulsão química é preferida por ser indolor e sem risco de sangramento, contudo, o agente queratolítico pode causar irritação local e ter odor desagradável. Já a cirurgia é contraindicada para indivíduos com comorbidades (como diabetes, doenças autoimunes, problemas vasculares e paroníquia aguda), podendo gerar dor no pós-operatório (GUPTA, PAQUET, SIMPSON, 2013).

O desbridamento é caracterizado pela remoção mecânica da área infectada por meio de corte ou ainda redução da espessura por meio de abrasão. É uma solução que imediatamente traz bem-estar ao indivíduo, melhorando tanto a permeação quanto a aparência das unhas, porém requer constante manutenção visto o contínuo crescimento destas. Comumente, combina-se o uso de agentes antifúngicos, tanto a este procedimento quanto ao de avulsão, para aumento da eficácia dos mesmos (BEUSCHER, KELECHI, 2019; GUPTA, PAQUET, SIMPSON, 2013).

2.2.5.3 Terapia oral

É indicada para casos de onicomicose moderada a severa (com comprometimento da matriz, de mais de 50% da unha ou ainda de muitas unhas) e para pacientes que não respondam à terapia tópica após 6 meses de uso e contraindicada para gestantes e lactantes, pois o fármaco pode ser excretado no leite materno e também pode afetar o desenvolvimento fetal. É passível de interação medicamentosa em pacientes que apresentem comorbidades, devido ao uso de medicação contínua. Os efeitos colaterais são diversos e incluem dor de cabeça, erupções cutâneas ou reações adversas no trato gastrointestinal, além de hepatotoxicidade e insuficiência cardíaca (GUPTA et al., 2013; KREIJKAMP-KASPERS et al., 2017).

Os antifúngicos orais são a principal escolha terapêutica no tratamento de onicomicose, visto sua maior eficácia e menor tempo de tratamento em relação aos

agentes tópicos. Terbinafina, itraconazol e fluconazol são os principais agentes utilizados nesta modalidade de tratamento (GUPTA et al., 2013, 2017; KREIJKAMP-KASPERS et al., 2017).

Considerada como tratamento de primeira linha, a terbinafina é administrada, no caso de adultos, em doses diárias de 250 mg durante 6 semanas nas unhas das mãos e de 12 a 16 semanas nas unhas dos pés. Já em crianças, a dosagem varia conforme o peso. As taxas de cura micológica e completa decorrentes deste tratamento são de 60% e de 44 a 46%, respectivamente. Associados ao uso deste fármaco têm-se efeitos colaterais como insuficiência hepática, alterações temporárias ou permanentes do olfato e do paladar, dispepsia, depressão, sonolência, cefaleia, visão turva, vômitos, cólicas e eczema. Apresenta potencial interação com fármacos como metoprolol, cimetidina, rifampicina, varfarina, nortriptilina, niacinamida e fenobarbital; logo, a terbinafina é contraindicada para pacientes que façam uso destas medicações ou com disfunções hepáticas (GUPTA, 2013, 2017; PERUSINHA, ROSADO, LENCASTER, 2019; ROSEN, STEIN GOLD, 2016).

Outro tratamento de primeira linha é o itraconazol, cuja prescrição é de uma dose diária de 200 mg por 12 semanas ou na forma intervalada (pulsos), com duas doses diárias de 200 mg por 1 semana seguida de 3 semanas de pausa até outro pulso, sendo recomendados 2 pulsos para as unhas das mãos e 3 pulsos para as dos pés. Índices de cura micológica e completa para esta terapia são de 63 a 69% e 22%, respectivamente. Possíveis efeitos adversos incluem edema, náuseas, vômito, urticária, dores de cabeça e abdominal, vertigens, diarreia, problemas cardíacos (insuficiência e arritmia), perda auditiva e hepatotoxicidade. É passível de sofrer interação com medicações como as do grupo das estatinas (lovastatina, sinvastatina), metadona, triazolam, quinidina e pimozida (BEUSCHER, KELECHI, 2019; GUPTA, 2017; PERUSINHA, ROSADO, LENCASTER, 2019; ROSEN, STEIN GOLD, 2016).

Já o fluconazol costuma ser prescrito em regime de dosagem única semanal até que a unha infectada seja completamente renovada, o que implica em um tratamento que se entende de 6 até 18 meses. Os índices de cura micológica e completa atrelados a esta terapêutica são, respectivamente, de 55 a 59% e 20%. O uso deste fármaco é associado a náuseas, vômito, cefaleia, insuficiência renal, síndrome de Stevens-Johnson, diarreia, eritema fixo, convulsões, dores abdominais, hepatotoxicidade, além de defeitos congênitos, daí evitar-se o uso durante o primeiro trimestre de gestação e durante a lactação. Sua coadministração com fármacos como

antiarrítmicos (quinidina), antipsicóticos (pimozida) e anti-histamínicos (astemizol e terfenadina) é absolutamente contraindicada (GUPTA, 2017; PERUSINHA, ROSADO, LENCASTER, 2019; ROSEN, STEIN GOLD, 2016).

2.2.5.4 Terapia tópica

Recomendada em casos de onicomicose superficial e subungueal distal com até 50% de comprometimento da unha. Além disso, é indicada quando a infecção acomete poucas unhas (até quatro), ou quando há contraindicação da terapia oral (pacientes com comorbidades e que já façam uso de medicação). O risco de efeitos colaterais e interações medicamentosas é baixo em comparação com drogas sistêmicas, contudo a dificuldade de permeação do fármaco na placa ungueal é um fator limitante à eficácia do tratamento (BEUSCHER, KELECHI, 2019; GUPTA et al., 2013).

Recentemente, fármacos tópicos estão sendo incorporados em formulações de esmalte, como no caso da amorolfina e ciclopirox. O uso se entende por cerca de 48 semanas, podendo requerer desbridamento prévio para melhorar a permeação e, conseqüentemente, a eficácia da terapia (BENSON et al., 2019; BEUSCHER, KELECHI, 2019; GUPTA et al., 2013; PERUSINHA, ROSADO, LENCASTER, 2019).

O esmalte contendo amorolfina 5% deve ser aplicado uma ou duas vezes por semana por um período de 6 a 12 meses, com a superfície da unha previamente lixada e limpa. Registraram-se índices de cura micológica entre 60 e 76% e completa entre 38 a 54% no tratamento com adultos. Os possíveis efeitos colaterais são locais e incluem ardor, vermelhidão, irritação, prurido e dor (GUPTA et al., 2013; PERUSINHA, ROSADO, LENCASTER, 2019).

O ciclopirox é também disponibilizado na forma de esmalte na concentração de 8%, contando com duas formulações: uma mais comum contendo resina vinílica e outra, com melhor permeabilidade, contendo hidroxipropil quitosana. A aplicação deve ser feita na área infectada, já lixada e limpa, uma vez ao dia durante 24 semanas nas unhas das mãos e 48 semanas nas dos pés. A formulação convencional apresenta valores de cura micológica entre 5,5 e 8,5% e de cura completa entre 29 a 36% e necessita de remoção semanal do filme de esmalte com uso de álcool isopropílico. Já a segunda mostra um percentual de 12,7% de cura completa, sem necessidade de remoção do produto. Os efeitos colaterais registrados são os mesmos relatados para

o esmalte contendo amorolfina (GUPTA et al., 2013; PERUSINHA, ROSADO, LENCASTER, 2019; SONTHALIA, AGRAWAL, SEHGAL, 2019).

Aprovado para uso tópico pela *Food and Drug Administration* (FDA) em 2014, a solução de eficonazol 10% surge como alternativa terapêutica no tratamento da onicomicose. Com posologia idêntica às anteriormente descritas (1 vez ao dia por 48 semanas) é aplicada tanto na superfície quanto na região periungueal, sem qualquer desbridamento prévio. A baixa afinidade do fármaco pela queratina faz com que a permeabilidade do mesmo na unha seja aumentada. Os índices de cura micológica situam-se entre 53 e 55% e de cura completa entre 15 e 18%. Efeitos colaterais como nasofaringite, sinusite e infecção do trato respiratório superior foram relatadas em estudo feito por Elewski et al. (2013), além daqueles locais, como dor e dermatite (ELEWSKI et al., 2013; PERUSINHA, ROSADO, LENCASTER, 2019; ZANE et al., 2016).

Também aprovado no mesmo ano pela FDA, o tavaborol é disponibilizado na forma de solução a 5%, com aplicação na unha e perioníquio e posologia idêntica à do eficonazol (1 vez ao dia por 48 semanas, sem desbridamento). O baixo peso molecular (152 kDa) é responsável por melhorar sua permeação na estrutura ungueal. A taxa de cura completa é de 7 a 9% e de cura micológica, de 31 a 36%, sendo esfoliação, eritema e dermatite os efeitos colaterais mais comumente relatados em decorrência deste tratamento (PERUSINHA, ROSADO, LENCASTER, 2019; ZANE et al., 2016).

2.2.5.5 Terapias biofísicas

Devido às limitações impostas pelas terapias oral e tópica (potenciais efeitos colaterais, toxicidade, interações medicamentosas e dificuldade de permeação do fármaco na unha), torna-se necessário o desenvolvimento de novas modalidades terapêuticas que sejam mais eficazes e seguras à saúde do paciente. Neste sentido, as terapias fotodinâmica e a *laser* vêm se tornando cada vez mais populares, visto que raramente apresentam efeitos colaterais ou mesmo interações medicamentosas, sendo então indicadas, sobretudo, no caso de pacientes idosos, imunocomprometidos ou com disfunções renais e hepáticas (BHATTA, KEYAL, WANG, 2016; BHATTA et al., 2017).

A terapia a *laser* conta com o uso de *lasers* como o de Nd:YAG (do inglês *neodymium-doped yttrium aluminum garnet*), de dióxido de carbono e de diodo no infravermelho próximo (870 nm e 930 nm). O mecanismo de ação baseia-se no processo de fototermólise seletiva, que consiste na absorção da energia provinda da radiação do *laser* por um cromóforo presente na célula fúngica, desencadeando reações fotoquímicas (formação de espécies reativas de oxigênio) e fototérmicas (aquecimento do tecido fúngico), responsáveis pela morte do fungo (BHATTA et al., 2017; GUPTA et al., 2013).

Já a terapia fotodinâmica envolve a combinação de uma fonte de luz (vermelha, azul, LED ou *laser*), um agente sensibilizador (ácidos 5-aminolevulínico e metilaminolevulínico, hipericina, azul de metileno, rosa bengala) e presença de oxigênio. Seu mecanismo de funcionamento pode se dar através de duas reações: do tipo I e do tipo II, sendo a primeira caracterizada pela reação do agente fotossensibilizador no estado excitado com moléculas orgânicas, convertendo-as em radicais que, em contato com oxigênio, resultam em uma mistura de radicais livres de oxigênio ($\text{OH}\cdot$ e $\text{O}_2\cdot$) e a segunda pela reação deste agente no mesmo estado com oxigênio molecular, gerando oxigênio singleto ($^1\text{O}_2$). As espécies formadas são altamente reativas e, portanto, capazes de reagir com uma ampla gama de biomoléculas, como lipídeos, proteínas e ácidos nucleicos, culminando na morte celular do fungo (BHATTA et al., 2017; SILVA, 2017).

Para que o agente alcance melhor permeação na unha, deve ser feito o pré-tratamento da mesma com aplicação de pomada à base de ureia para enfim dar início ao procedimento. Após o término, recomenda-se evitar a exposição da área tratada ao sol por no mínimo 48 horas e atividades físicas pesadas e saunas por pelo menos 24 horas (BENSON et al. 2019; BHATTA et al., 2017).

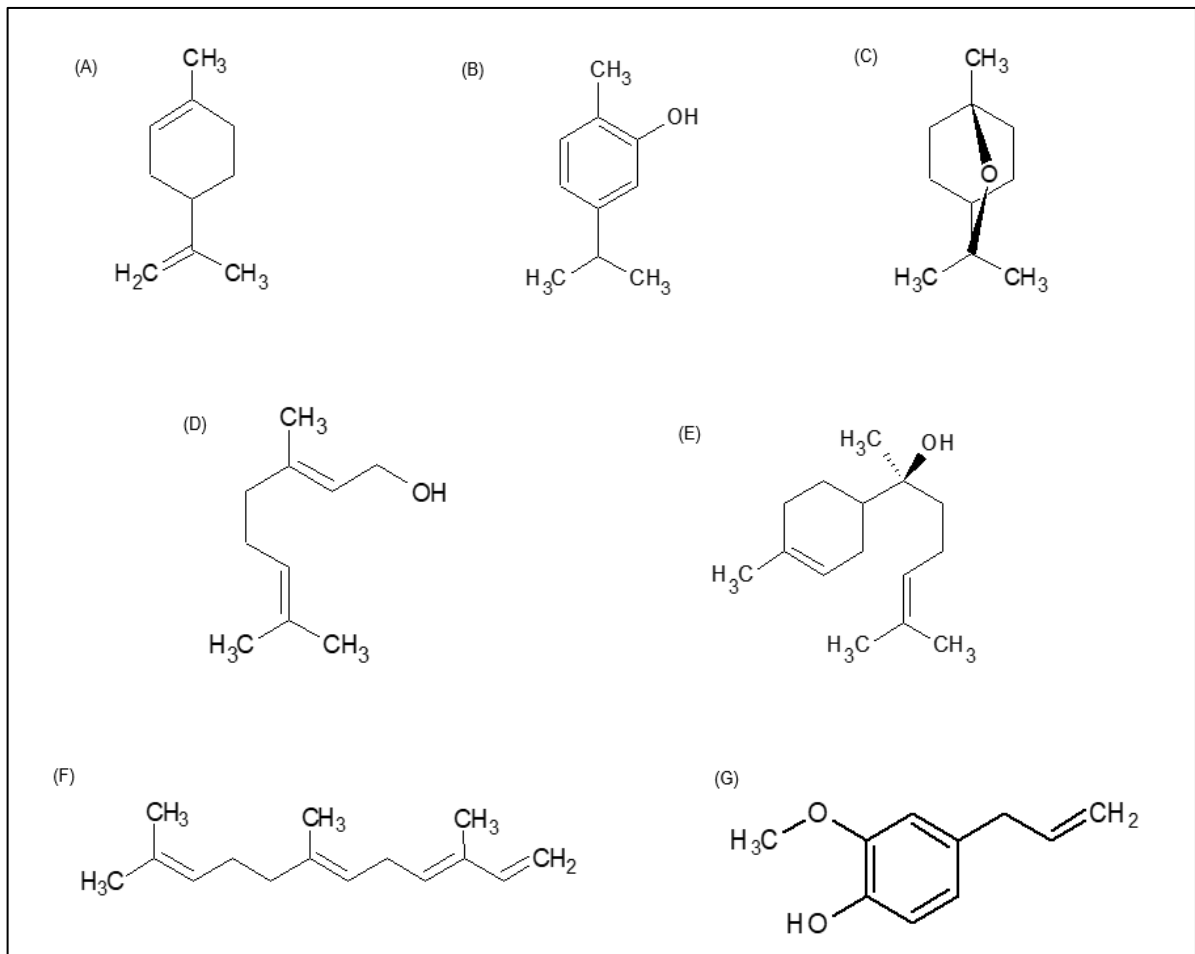
Como ambas as terapias estão em desenvolvimento, ainda não há um protocolo padrão regulamentando as condições ótimas dos parâmetros de cada uma delas (tipo de luz, frequência, número de sessões, duração e intervalo entre elas); logo, mais estudos neste sentido devem ser feitos para então poder estabelecer os índices de eficácia das respectivas terapias (BHATTA et al., 2017; GUPTA et al., 2013).

2.3 ÓLEOS ESSENCIAIS

São caracterizados como líquidos voláteis odoríferos, geralmente incolores e de caráter predominantemente lipofílico, armazenados em diversas estruturas das plantas (folhas, fruto, sementes, raiz ou caule). Desenvolvem papéis de proteção contra patógenos, insetos e herbívoros bem como de atração de agentes polinizadores e espalhadores de sementes, que são fundamentais à sobrevivência da espécie vegetal (BUTNARIU, SARAC, 2018; LOPES, PINTO, SALGUEIRO, 2017).

Os óleos essenciais (OEs) são constituídos por uma mistura complexa de metabólitos secundários pertencentes, em sua maioria, à classe dos terpenos (com predominância de mono e sesquiterpenos e seus derivados oxigenados), bem como de outras classes como fenilpropanoides, ácidos graxos e, raramente, derivados de enxofre e de nitrogênio (Figura 10). A composição química é variável e dependente de fatores como órgão de extração, localização geográfica, clima e composição do solo em que a planta foi cultivada e tipo de extração; sendo assim, sua caracterização é feita a partir de técnicas como a cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG-MS). Geralmente, cada óleo apresenta até 100 constituintes nas mais diversas concentrações, sendo 2 ou 3 destes os mais abundantes (entre 20 e 70%), contando com a destilação como principal método de extração (LOPES, PINTO, SALGUEIRO, 2017; SWAMY, AKHTAR, SINNIHAH, 2016).

Figura 10 - Estruturas químicas de compostos encontrados em óleos essenciais: monoterpenos - limoneno (A), timol (B), 1,8-cineol (C) e geraniol (D), sesquiterpenos – bisabolol (E) e farneseno (F) – e fenilpropanoides – eugenol (G).



Sabe-se que tais óleos vêm sendo utilizados desde a antiguidade em ritos religiosos e também com fins medicinais e cosméticos, e desde então, sua produção vem crescendo tanto em volume quanto em diversidade. Dos cerca de 3000 óleos conhecidos, aproximadamente 150 são mundialmente comercializados, e devido às suas propriedades anti-inflamatória, antioxidante, analgésica e antimicrobiana, encontram cada vez mais aplicações nos setores alimentício, farmacêutico, sanitário, cosmético, perfumaria, na agronomia e na aromaterapia. Mundialmente, os maiores produtores destes insumos são China, Índia, Indonésia, Sri Lanka e Vietnã, sendo Alemanha, Reino Unido e França os principais compradores (BARBIERI, BORSOTTO, 2018; NAZZARO et al., 2017).

Como o uso dos agentes antimicrobianos convencionais está associado ao desenvolvimento de microrganismos cada vez mais resistentes, bem como a danos ambientais e à saúde do indivíduo, faz-se necessária a constante busca por agentes

cada vez mais naturais e seguros em substituição aos tradicionais, de origem sintética. Por serem de origem natural, os óleos essenciais não apresentam tais limitações, representando assim uma nova alternativa terapêutica no tratamento de infecções fúngicas (NAZZARO et al., 2017).

A atividade antifúngica de um óleo essencial está diretamente relacionada à sua composição química, contudo seu mecanismo de ação, bem como de seus constituintes ainda não está totalmente elucidado, necessitando cada vez mais de estudos neste sentido. Possivelmente, tal atividade está atrelada ao sinergismo entre os constituintes ou ainda à função orgânica a que eles pertencem (SAAD, MULLER, LOBSTEIN, 2013; ZUZARTE et al, 2011).

Os OEs atuam sobre diversos alvos na célula fúngica, comprometendo a estrutura e função de membranas, parede celular e organelas. Pinto et al. (2006) observou a inibição da síntese de ergosterol em *C. albicans* e *T. rubrum* por ação do óleo de *Thymus pulegioides*. Hu et al. (2019) mostrou que os óleos de cravo e canela foram capazes de inibir a germinação de esporos e o crescimento micelial em três espécies de *Aspergillus*. No estudo feito por Rasooli, Rezaei e Allameh (2006), a micrografia de células de *Aspergillus niger* tratadas com óleos de *Thymus eriocalix* e *Thymus x-porlock* revelou o colapso das hifas dos fungos bem como o espessamento da parede celular, além de destruição das mitocôndrias, redução do conteúdo citoplasmático e danos à membrana nuclear. Já no trabalho de Park et al. (2007), a micrografia do tratamento de *T. mentagrophytes* com eugenol (principal componente do óleo de cravo) indicou a destruição das membranas internas mitocondriais e a expansão do retículo endoplasmático fúngico.

Da análise dos componentes de forma isolada, percebe-se que a atividade antifúngica está associada ao grupo funcional presente em sua estrutura, decrescendo da seguinte forma: fenóis > aldeídos > cetonas > álcoois > éteres > hidrocarbonetos. Em relação ao terpenoides fenólicos, quanto mais substituintes ligados ao anel benzênico, maior o efeito antifúngico. Ainda em relação a esta classe, seu mecanismo de ação está relacionado ao transporte de íons entre os meios extra e intracelular do microrganismo, pois por apresentar ressonância, o composto fenólico (como timol e carvacrol) dissocia-se facilmente, liberando o íon H^+ e em seguida ligando-se ao íon K^+ e transportando-o para o meio extracelular. Tal processo é responsável por dissipar o gradiente de tais íons, culminando em alterações nos

processos celulares e, finalmente, na morte da célula microbiana (SAAD, MULLER, LOBSTEIN, 2013).

2.3.1 Óleo Essencial de Orégano (*Origanum vulgare* L.)

O orégano é uma planta aromática de pequeno porte (30 a 50 cm de altura), com flores brancas ou arroxeadas e folhas opostas, dentadas e lanceoladas, pertencente à família das lamiáceas (Figura 11). Amplamente difundida nas regiões mediterrânea e asiática, encontra aplicações medicinais no tratamento de resfriados e de desordens estomacais, menstruais e brônquicas. A porção aérea da planta contém compostos bioativos, em sua maioria, da classe dos terpenoides, mas também glicosídeos fenólicos, taninos e esteróis, sendo todos estes responsáveis pelas atividades antimicrobiana, antiviral, antioxidante, anti-inflamatória e antiespasmódica da planta. É dela também que se extrai o óleo essencial (ONIGA et al., 2018; PEZZANI, VITALINI, IRITI, 2017).

FIGURA 11 – Parte aérea da planta *Origanum vulgare*.



Fonte: Pezzani, Vitalini, Iriti (2017).

O óleo essencial de orégano (OEO) é majoritariamente constituído por moléculas como carvacrol e timol, que são as principais responsáveis pelas propriedades antioxidante, anti-inflamatória, antiespasmódica e antimicrobiana do óleo (CUI, 2019).

Os mecanismos de ação deste óleo, assim como dos demais óleos essenciais, não estão totalmente elucidados, uma vez que são múltiplos por conta de sua complexa composição e acabam por atuar sobre diversos alvos na célula microbiana (KACANIOVÁ et al. 2019).

Segundo Cui et al. (2019), o tratamento de *S. aureus* com OEO resultou na redução do crescimento do patógeno bem como na alteração da morfologia de sua célula, observando-se a danificação da membrana celular, a perda da atividade metabólica e a depleção das vias de metabolismo respiratório e de produção de energia na célula bacteriana, culminando em sua morte. No trabalho de Alexopoulos (2019), OEO foi capaz de causar a ruptura da membrana celular de *S. aureus* e *coli*. Em estudo feito por Babosa et al. (2020), o referido óleo foi capaz de penetrar na célula da bactéria *Salmonella enteritidis* e danificar seu material genético. Do tratamento de espécies de *Alicyclobacillus* com OEO feito por Dutra et al. (2019), observou-se a ruptura da parede celular e deformação na estrutura do bacilo. Já no estudo de Wijesundara, Rupasinghe (2018), houve redução na formação de biofilme bem como no tamanho e formato da célula de *S. pyogenes*.

Quanto ao espectro de ação, OEO mostra-se eficiente frente a bactérias Gram-positivas (*Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*) e Gram-negativas (*Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*), além de fungos dermatófitos (*Microsporum gypseum*, *Microsporum canis*, *Trichophyton violaceum*, *Trichophyton mentagrophytes*, *Trichophyton rubrum*, *Trichophyton tonsurans* e *Epidermophyton floccosum*), não-dermatófitos (*Aspergillus niger*) e leveduras (*Candida albicans*) (SWAMY, AKHTAR, SINNIHA, 2016).

2.3.2 Óleo Essencial de Alecrim (*Rosmarinus officinalis* L.)

O alecrim é uma planta originária da região mediterrânea pertencente à família das lamiáceas. De porte arbustivo, mede cerca de 1 metro de altura, apresentando folhas verde escuras com 1 a 4 cm de comprimento e 2 a 4 mm de largura, flores azul-esbranquiçadas e aroma característico (Figura 12). Encontra aplicações na medicina tradicional devido às suas propriedades hipoglicemiante, anti-hipertensiva, hipocolesterolêmica, anti-inflamatória, antidepressiva, antiespasmódica, diurética, expectorante e anticonvulsiva, sendo seu extrato empregado como conservante nos setores alimentício e cosmético devido às propriedades antimicrobiana e antioxidante.

Tais propriedades estão ligadas principalmente aos compostos fenólicos presentes tanto no extrato quanto no óleo essencial da planta (ANDRADE et al., 2018; HASSANI, SHIRANI, HOSSEINZADEH, 2016).

Figura 12 – Porção aérea da planta *Rosmarinus officinalis*.



Fonte: Humphreys (2017).

O óleo essencial de alecrim (OEA) pode ser obtido por meio de destilação a vapor de suas folhas ou ramos, sendo incolor ou levemente amarelo, hidrofóbico e com cheiro característico de cânfora. Seus componentes majoritários são 1,8-cineol, cânfora, α -pineno, β -pineno, borneol e limoneno, contudo são compostos fenólicos como os ácidos rosmarínico e carnósico, carnosol e rosmanol e seus respectivos derivados, os responsáveis pelas atividades biológicas do óleo. Estes são capazes de interagir com proteínas e ácidos graxos presentes na membrana celular do microrganismo e com seu material genético, implicando em modificações estruturais nestes alvos, e conseqüentemente na perda de suas funções, comprometendo assim a integridade e replicação da célula microbiana (ANDRADE et al., 2018; NIETO, ROS, CASTILLO, 2018; SATYAL et al., 2017).

Quanto ao espectro de ação, OEA mostra-se eficaz contra bactérias como *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas vulgaris*, *Aeromonas hydrophila*, *Bacillus cereus* e *Salmonella choleraesuis*, além de fungos dos gêneros *Tricophyton* (*T. violaceum*, *T. mentagrophytes*, *T. rubrum*, *T. tonsurans*), *Microsporum* (*M. canis*, *M. gypseum*),

Epidermophyton floccosum e *Candida albicans* (NIETO, ROS, CASTILLO, 2018; SWAMY, AKHTAR, SINNIHAH, 2016).

2.4 NANOPARTÍCULAS DE PRATA

As nanopartículas de prata (NPAg) consistem em partículas de prata cujo tamanho situa-se entre 1 e 100 nm. Sua síntese pode ocorrer através de processos físicos, químicos ou biológicos, envolvendo baixo custo de produção. Apresentam propriedades ópticas, catalíticas, anti-inflamatórias e antimicrobianas (contra fungos, bactérias, vírus e protozoários), além de elevada condutividade térmica e elétrica, estabilidade química, maleabilidade e flexibilidade, sendo por isso amplamente empregadas na área médica e nos setores alimentício, têxtil, farmacêutico, cosmético, agrícola, sanitário, de tintas e eletroeletrônicos, por exemplo (AHMAD et al., 2019; DURAN et al., 2019).

2.4.1 Mecanismo de Ação

Os mecanismos pelos quais as NPAg atuam na inibição do crescimento microbiano são múltiplos e incluem: (1) a reação com elementos como fósforo e enxofre presentes, respectivamente, no grupo fosfato da estrutura do DNA e no grupo tiol de enzimas e de proteínas da membrana celular, destruindo tais estruturas (2), a formação de espécies reativas de oxigênio capazes de danificar os componentes da célula microbiana, (3) a interrupção da cadeia transportadora de elétrons na mitocôndria do microrganismo, (4) acumulação na parede celular, sendo capaz de penetrar na célula do patógeno e alterar a integridade da membrana celular. Tais processos culminam em alterações na estrutura dos respectivos alvos e conseqüentemente na perda de suas funções, resultando na morte da célula microbiana (PRABHU, POULOSE, 2012; ABBASI et al., 2016; BOCATE et al., 2019).

2.4.2 Métodos de Síntese

2.4.2.1 Método físico

Os métodos mais comuns de síntese física incluem processos como ablação a *laser* e evaporação-condensação. A ausência de reagentes químicos no meio reacional garante a formação de nanopartículas livres de contaminação pelos mesmos, o que constitui uma vantagem em relação aos métodos de síntese química (ABBASI et al., 2016; IRAVANI et al., 2014).

A produção das NPAg por evaporação-condensação é executada utilizando-se um forno de tubo sob pressão atmosférica. Tal procedimento torna-se desvantajoso devido ao fato de o forno consumir grande quantidade de energia para funcionar e também requerer um longo tempo de pré-aquecimento até atingir a temperatura ideal de trabalho (ABBASI et al., 2016; GE et al., 2014; IRAVANI, 2014).

Outro método de síntese consiste na ablação por *laser* da prata metálica em solução, com ou sem surfactantes. A eficiência do procedimento bem como as características das NPAg formadas dependem de parâmetros como o comprimento de onda do laser, a duração do seu pulso, tempo de duração da ablação e a composição do meio reacional (presença ou não de surfactantes) (GE et al., 2014; IRAVANI, 2014; RATTI et al., 2017).

2.4.2.2 Método químico

Este método conta com o uso de um sal de prata (normalmente AgNO_3), um agente redutor (orgânico ou inorgânico) e um agente protetor. O processo é baseado na redução química de íons prata (Ag^+) à prata metálica (Ag^0), em meio aquoso ou não-aquoso. Dentre os agentes redutores empregados no meio estão citrato/ascorbato de sódio, borohidreto de sódio, gás hidrogênio, reagente de Tollens e N, N-dimetilformamida (DMF) (GE et al., 2014; IRAVANI et al., 2014).

O uso de agente protetor faz-se necessário, pois a interação deste com a superfície das nanopartículas estabilizam o crescimento das mesmas e impede a aglomeração e sedimentação entre elas. Exemplos destes agentes incluem surfactantes das classes dos tióis, aminas, ácidos e álcoois e polímeros como álcool

polivinílico, polivinilpirrolidona, polietilenoglicol e polimetilmetacrilato (IRAVANI et al., 2014).

Normalmente, a síntese química permite o controle do tamanho de partícula a por conta do controle das condições experimentais. Em alguns casos, pode-se empregar reagentes tóxicos, gerando subprodutos igualmente tóxicos, bem como requerer a presença de atmosfera inerte e controle de temperatura, fazendo-se sempre necessário o recobrimento da superfície das nanopartículas ao final do processo a fim de evitar sua oxidação (DURAN et al., 2019).

2.4.2.3 Método biológico

Como a maioria dos métodos físicos e químicos de síntese de NPAg costumam ser de alto custo e empregar reagentes tóxicos, faz-se necessário o desenvolvimento métodos sintéticos alternativos que sejam ambientalmente e economicamente viáveis. Neste sentido, os métodos biológicos surgem como alternativas sustentáveis de síntese uma vez que são considerados simples, de baixo custo e não contam com o uso de reagentes tóxicos no procedimento. A síntese biológica pode ser feita a partir de fungos (*Fusarium oxysporum*, *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus flavus*), bactérias (*Bacillus licheniformis*, *Lactobacillus fermentum*, *Escherichia coli*) e extratos de plantas (*Aloe vera*, *Camellia sinensis*, *Medicago sativa*), sendo a morfofisiologia das partículas influenciada pelas condições de reação, como concentração do sal metálico, pH, luz, temperatura, tipo de tampão e agente redutor (ABBASI et al., 2016; IRAVANI et al., 2014; PRABHU, POULOSE, 2012).

O mecanismo de produção das NPAg é pautado na reação de redução do íon Ag^+ (oriundo, por exemplo, de AgNO_3) por vias enzimáticas ou não-enzimáticas. No caso de bactérias e do fungo *Fusarium oxysporum*, a biorredução se dá por meio de da enzima dependente de NADPH nitrato redutase, que converte nitrato em nitrito, sendo que o elétron liberado é transferido ao íon metálico por meio de um agente transportador de elétrons intracelular, como NADPH. Já no caso dos fungos, a síntese ocorre devido à redução do cátion metálico por proteínas extracelulares do fungo, como naftoquinonas e antraquinonas. Por fim, a síntese por meio de extratos de plantas está relacionada aos fotoquímicos nele presentes, que prontamente reduzem Ag^+ a Ag^0 . Neste caso, a reação costuma ser mais rápida, ocorrendo em poucos

minutos, sendo esta uma vantagem em relação à síntese enzimática, que pode levar de 24 a 120 horas para sua conclusão (AHMAD et al., 2019; ABBASI et al., 2016; GE et al., 2014; MABEY et al., 2019; PRABHU, POLOSI, 2012).

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Desenvolver formulações de esmalte, de uso tópico, acrescidas dos óleos essenciais de orégano e alecrim e de nanopartículas de prata biogênicas, isolados e/ou em associação, a fim de avaliar a atividade antimicrobiana *in vitro* contra os fungos *Trichophyton mentagrophytes*, *Trichophyton rubrum*, *Microsporum canis* e *Microsporum gypseum* como nova alternativa no tratamento da onicomicose.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Otimizar o desenvolvimento das formulações de esmalte por meio de planejamento estatístico;
- Avaliar a atividade antifúngica dos princípios ativos pelas metodologias de disco-difusão, microdiluição em caldo e concentração fungicida mínima;
- Realizar o teste de citotoxicidade dos ativos;
- Avaliar a atividade antifúngica das formulações através dos testes de disco-difusão e infecção ungueal;
- Verificar a permeação das formulações na unha por meio de espectroscopia fotoacústica;
- Avaliar, por microscopia eletrônica de varredura, o efeito das formulações sobre as unhas infectadas;
- Caracterizar farmacotecnicamente as formulações selecionadas;
- Realizar estudos de estabilidade com as formulações selecionadas.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 OBTENÇÃO DOS PRINCÍPIOS ATIVOS

Os óleos essenciais de orégano e alecrim foram adquiridos da empresa Ferquima Indústria e Comércio Ltda. (Vargem Grande Paulista, São Paulo, Brasil), cuja caracterização consta nos Anexos A e B. Já as nanopartículas de prata foram produzidas por meio de processo nanobiotecnológico a partir do fungo *Fusarium oxysporum*.

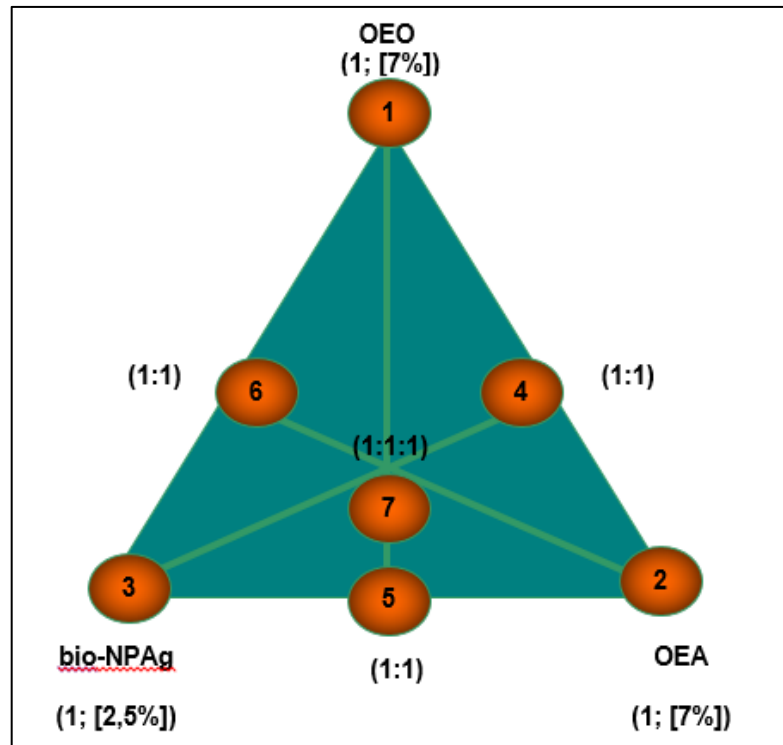
O fungo foi cultivado em meio líquido contendo extrato de malte (2%) e extrato de levedura (5%) e o crescimento foi acompanhado durante 7 dias a 30 °C. A biomassa fúngica foi filtrada e suspendida em água destilada estéril. Aproximadamente 10 g desta biomassa foram transferidos para um frasco contendo 100 mL de água destilada, mantendo-se sob agitação (150 rpm), a 30 °C por 72 h. A esta solução adicionou-se AgNO₃ (10⁻³ M) seguida de incubação no escuro por 14 dias a 30 °C. A caracterização das NPAg foi feita usando o *Zeta-APS* (Matec Applied Sciences, EUA) e por microscopia eletrônica de varredura, resultando em um tamanho médio de partícula de 90 nm e valores de potencial zeta maiores que +30mV e menores que -30mV (BOCATE et al., 2019).

4.2 DESENVOLVIMENTO DAS FORMULAÇÕES DE ESMALTE

A formulação do produto foi desenvolvida a partir do conceito mercadológico *5 free*, ou seja, isenta de componentes potencialmente alergênicos como dibutilftalato (DBP), 2-nitrotolueno, tolueno, furfural e formaldeído.

Foram preparadas formulações de esmalte, cujas concentrações dos ativos variaram de 2,5 % (v/v) a 7,0% (v/v), sendo estabelecidas de acordo com um planejamento experimental do tipo Centroide Simplex, com modificações, conforme ilustrado na Figura 13 (NETO; SCARMINIO; BRUNS, 2001). A formulação base foi composta por acetato butirato de celulose, álcool isopropílico, acetato de etila e acetato butirato de sacarose, cujas concentrações não foram explícitas por motivo de depósito de patente.

Figura 13 - Planejamento Centróide Simplex, com modificações, para desenvolvimento das formulações de esmalte contendo os três ativos: OEO, OEA e bio-NPAG.



Os pontos enumerados podem ser entendidos da seguinte forma: nos vértices, encontram-se as formulações contendo os ativos puros em suas concentrações máximas, isto é, (1) OEO a 7,0 % (v/v), (2) OEA a 7,0 % (v/v) e (3) bio-NPAG a 2,5 % (v/v). Já nas arestas, os pontos 4, 5 e 6 representam as misturas binárias de OEO e OEA, OEA e bio-NPAG e OEO e bio-NPAG, respectivamente, e finalmente o ponto 7, a mistura dos três ativos. As formulações desenvolvidas encontram-se listadas na Tabela 1.

Tabela 1 – Composição de sete formulações de esmalte contendo óleos essenciais de orégano (OEO) e alecrim (OEA) e nanopartículas de prata biogênicas (bio-NPAg) isoladamente e/ou em associação e uma formulação base (FB), que é isenta de ativos.

Composição	Formulação (%; v/v)							
	FOO	FOA	FAG	FOOA	FAAG	FOAG	FOAAG	FB
Formulação	q.s.p	q.s.p	q.s.p	q.s.p	q.s.p	q.s.p	q.s.p	q.s.p
base	100	100	100	100	100	100	100	100
OEO	7,0	-	-	3,5	-	3,5	2,33	-
OEA	-	7,0	-	3,5	3,5	-	2,33	-
Bio-NPAg	-	-	2,5	-	1,25	1,25	0,83	-

Para avaliar o comportamento do produto a ser desenvolvido foi utilizado um esmalte comercial contendo cloridrato de amorolfina a 5% (m/v) como padrão comparativo (FP), além da formulação base (FB) como controle negativo.

4.3 CARACTERIZAÇÃO FARMACOTÉCNICA

As formulações que apresentaram as melhores respostas aos testes antimicrobianos foram submetidas a caracterizações de pré-estabilidade (centrifugação), organolépticas (aspecto, cor e odor) e físico-químicas (pH, densidade e tempo de secagem).

4.3.1 Análise de Pré-estabilidade

As amostras foram submetidas à centrifugação, em triplicata, sendo 5 mL de cada formulação transferidos para tubos de ensaio e centrifugadas a 3200 rpm por 30 minutos à temperatura ambiente (25°C). Posteriormente, houve análise visual para detecção de possíveis modificações ou instabilidades como separação de fases, formação de sedimento compacto e/ou coalescência (BRASIL, 2007).

4.3.2 Análise Organoléptica

As características avaliadas nas formulações foram o aspecto, a cor e o odor e comparadas com o controle negativo (BRASIL, 2007).

Quanto ao aspecto, este foi observado macroscopicamente após 24 h do preparo das amostras, avaliando-se visualmente se estas apresentaram alterações do tipo separação de fases, precipitação ou turvação e se mantiveram as mesmas características do controle.

Já a coloração foi verificada visualmente sob luz branca e fundo preto diretamente na embalagem em que cada uma estava acondicionada (frasco de vidro transparente), sendo igualmente comparadas com o controle (FB) armazenado nas mesmas condições e embalagem que a amostra.

A análise do odor igualmente se deu de modo comparativo diretamente através do olfato.

Feitas as caracterizações isolada e comparativamente, cada amostra foi classificada como: normal, sem alteração, levemente modificada, modificada ou intensamente modificada.

4.3.3 Análises Físico-químicas

As características físico-químicas avaliadas foram os valores de pH, densidade e tempo de secagem.

4.3.3.1 Determinação do pH

A determinação do pH de cada formulação se deu por meio de peagâmetro digital, calibrado com soluções tampão de referência (pH 4,0 e 7,0) à temperatura ambiente ($25 \pm 5^\circ\text{C}$), com inserção do eletrodo diretamente na amostra (BRASIL, 2007).

4.3.3.2 Densidade

A avaliação da densidade foi feita, em triplicata, utilizando-se picnômetro de vidro. Os valores foram obtidos por meio da equação (1) e expressos em g cm^{-3} (BRASIL, 2007).

$$d = \left(\frac{M_2 - M_0}{M_1 - M_0} \right) \quad (1)$$

Sendo: M_2 : massa do picnômetro com a amostra, M_1 : massa do picnômetro com água e M_0 : massa do picnômetro vazio.

4.3.3.3 Tempo de secagem

O tempo de secagem foi avaliado por meio da aplicação de uma fina camada do esmalte (100 µL) sobre uma placa de Petri, com auxílio de aplicador, e acionamento imediato do cronômetro. O tempo em que não mais se observou marcas ao toque do dedo no filme foi estabelecido como o tempo de secagem da formulação. Tal teste foi feito em triplicata, com o resultado expresso em segundos representando a média das três determinações. (SHAH, JOBANPUTRA, 2018, com modificações).

4.4 ENSAIOS ANTIMICROBIANOS

4.4.1 Obtenção e Cultivo dos Microrganismos

As cepas dos fungos *Trichophyton rubrum*, *Trichophyton mentagrophytes*, *Microsporum canis* e *Microsporum gypseum* foram obtidas do estoque presente no Laboratório de Micologia Médica e Microbiologia Bucal, da Universidade Estadual de Londrina (LAMIC – UEL), sendo armazenadas sob congelamento (-20 °C) em uma solução de glicerol 40% (v/v).

Cada estirpe foi transferida para tubos de ensaio contendo meio sólido de batata dextrose e ágar (BDA), sendo então incubadas em estufa de temperatura controlada (BOD) a 25 ± 5 °C por aproximadamente 14 dias, garantindo assim crescimento fúngico adequado para execução dos testes antimicrobianos subsequentes.

4.4.2 Teste de Disco-difusão

Tal ensaio foi feito, em triplicata, conforme recomendação do documento M44-A2, do *Clinical & Laboratory Standards Institute* (CLSI, 2009). Em placas de Petri contendo meio de batata, dextrose e ágar (BDA) foram semeados 100 µL de suspensão fúngica, em uma concentração de 10^4 esporos mL⁻¹. Então, 10 µL do ativo foram adicionados ao centro da placa, com posterior incubação em estufa do tipo BOD à temperatura de 25 ± 5 °C durante 72 horas. Transcorrido este período, observou-se visualmente o crescimento micelial. Tal procedimento foi igualmente aplicado às formulações de esmalte, utilizando-se as formulações base (FB) e padrão (FP) como padrões comparativos.

4.4.3 Teste de Microdiluição em Caldo

Por conta do caráter lipossolúvel, inicialmente foi preparada uma solução alcoólica com cada óleo essencial (40%; v/v), que sofreu nova diluição em meio RPMI-1640 na proporção 1:20, resultando em uma concentração final de 2%. Então, 100 µL desta solução foram adicionados a uma placa de 96 poços contendo 100 µL de suspensão fúngica (10^4 esporos mL⁻¹) e o mesmo volume de meio RPMI, sofrendo então diluição seriada. A placa foi incubada em estufa BOD a 25 ± 5 °C por 72 horas e o resultado obtido por análise visual, sendo a menor concentração capaz de inibir totalmente o crescimento microbiano correspondente à concentração inibitória mínima (CIM) do ativo (TULLIO, et al., 2007; CLSI, 2008). O teste foi feito em triplicata para cada bioativo, sendo que as nanopartículas não necessitaram de diluição prévia por conta do caráter hidrofílico.

4.4.4 Teste da Concentração Fungicida Mínima (CFM)

Utilizando-se das placas do teste de microdiluição, a partir de cada poço que apresentou inibição completa do crescimento fúngico foram tomados 10 µL e transferidos para placas contendo meio de BDA. Tais placas permaneceram incubadas em estufa BOD a 25 ± 5 °C durante 72 horas. Após este período, foram analisadas visualmente, sendo a menor concentração capaz de inibir completamente o crescimento microbiano equivalente à concentração fungicida mínima do ativo (HAMMER, CARSON, RILEY, 2002).

4.4.5 Teste de Infecção Ungueal

4.4.5.1 Obtenção das amostras de unha

As amostras foram coletadas de voluntários de ambos os sexos entre 18 e 60 anos por meio de corte normal, sem necessidade de treinamento específico para a tarefa. Feita a coleta, as unhas foram armazenadas em recipiente limpo e então autoclavadas para uso posterior. Como unhas cortadas são consideradas como material *ex vivo*, não houve necessidade de submissão do projeto ao comitê de ética.

4.4.5.2 Infecção ungueal

Este teste foi feito conforme descrito por Rashid, Scott, Richardson (1995), com modificações. Inicialmente, foram preparados 10 mL de suspensão, da ordem de 10^5 esporos mL^{-1} , de cada fungo e a cada uma delas foram adicionadas unidades de unha autoclavadas, sendo o conteúdo submetido à agitação (150 rpm, 25 °C) durante 2 horas. Em seguida, as unhas infectadas foram transferidas para placas de Petri contendo algodão, previamente autoclavado, embebido em água estéril para manter a umidade do ambiente. As placas foram incubadas em estufa BOD a 25 ± 5 °C durante 14 dias, posteriormente havendo tratamento das unhas com as formulações, juntamente com o controle negativo e o padrão, em dias alternados, durante 15 dias. Ao 5°, 10° e 15° dias de tratamento, um fragmento das mesmas foi cortado e transferido para placas contendo BDA para avaliação do crescimento microbiano.

4.5 AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE

Linhagens de células VERO (células de rim de macaco) foram cultivadas em placas de 96 poços por 24 h a 37 °C e a 5% de CO_2 . Então, a estas placas foram adicionados os ativos em suas concentrações máximas (OEO e OEA a 7% (v/v) e bio-NPAg a 2,5% (v/v)), procedendo com diluição seriada seguida de incubação por 72 h. A viabilidade celular foi determinada por ensaio de MTT [3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-difenil-2H-tetrazólio], de acordo com a recomendação do fabricante. A concentração necessária para inibir a viabilidade celular em até 50% corresponde à concentração citotóxica do ativo ($\text{IC}_{50/72\text{h}}$).

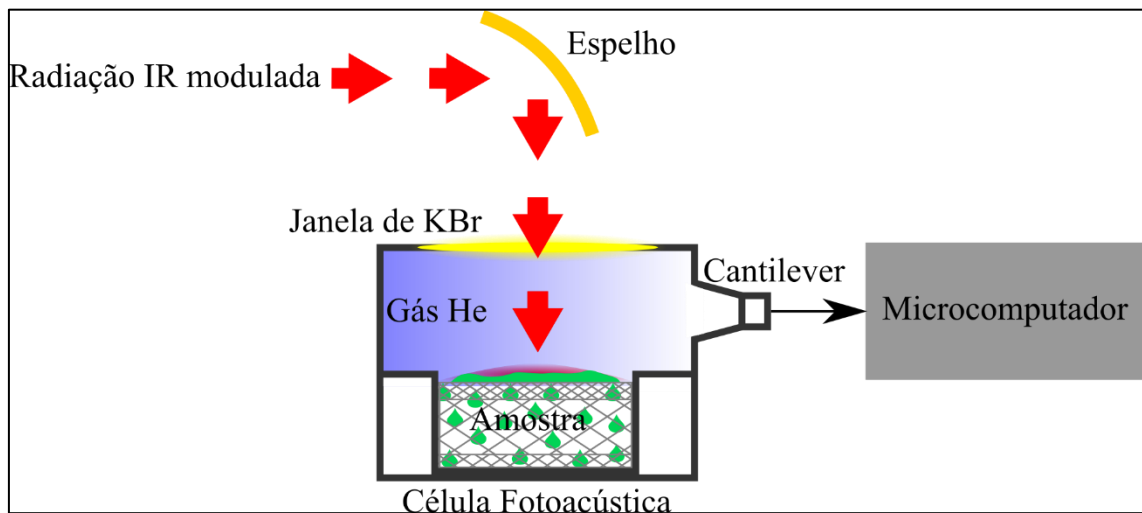
4.6 AVALIAÇÃO DA PERMEAÇÃO DAS FORMULAÇÕES NA UNHA

4.6.1 Espectroscopia Fotoacústica no Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR-PAS)

Os espectros foram obtidos utilizando um espectrômetro infravermelho por transformada de Fourier (BRUKER, Vertex 70v) equipado com uma célula de detecção fotoacústica (GASERA, PA 301). Nesta técnica, a radiação infravermelha modulada que incide sobre a amostra é absorvida e convertida em calor. O calor é difundido para a superfície da amostra que está em contato direto com um gás. Em

seguida, ocorre a expansão térmica do gás. O cantilever detecta as alterações de pressão resultantes, convertendo em sinais elétricos, produzindo assim interferogramas que são convertidos em espectros via transformada de Fourier (Figura 14).

Figura 14 - Diagrama esquemático da célula fotoacústica.



A célula fotoacústica preenchida com a amostra foi purgada com gás hélio antes de cada medição ser iniciada. Este procedimento aumenta a sensibilidade da técnica e minimiza a interferência espectral de moléculas como CO₂, por exemplo. A célula foi então selada e as medições iniciadas. Os espectros foram coletados na faixa espectral entre 3000 e 1000 cm⁻¹, com resolução de 8 cm⁻¹ e média de 128 varreduras. Os espectros de cada amostra foram obtidos, primeiramente, iluminando a face dorsal e em seguida, a face ventral. A profundidade da amostra de unha que contribui para o sinal fotoacústico foi estimada utilizando o comprimento de difusão térmica (μ_s) (Equação 2). Tomando a difusividade térmica da unha como $D = 10,0 \times 10^{-4} \text{ cm}^2/\text{s}^{-1}$ (DIAS et al., 2007) e a variação de $f = 303,74$ a $101,25 \text{ Hz}$, o valor de μ_s varia de 7,2 a 12,5 μm .

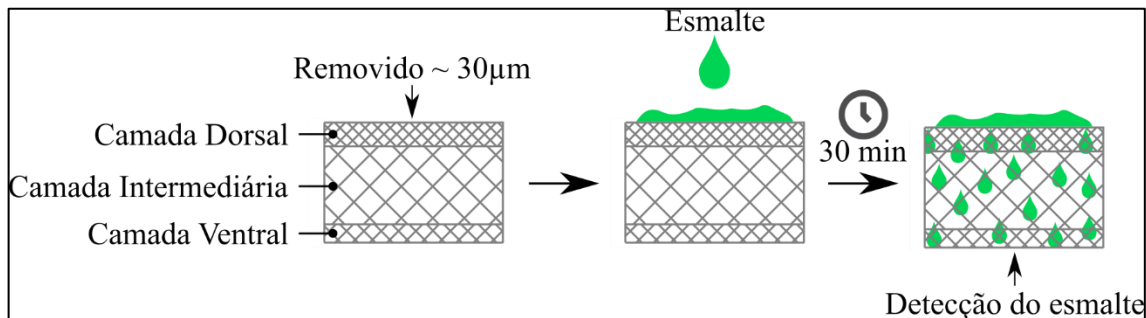
$$\mu_s = \left(\frac{D}{2\pi f} \right)^{1/2} ; \text{ com } f = \frac{v \times f'}{v'} \quad (2)$$

Sendo: D : difusividade térmica da amostra (cm^2/s), f : frequência de modulação no número de onda escolhido (Hz), f' : frequência de modulação no número de onda escolhido, f'' : frequência de modulação do laser, ν : número de Onda, ν' : número de onda do *laser*.

4.6.2 Análise da Permeação dos Esmaltes na Unha

Fragmentos de unha das mãos foram obtidos de voluntária adulta na faixa etária de 23 anos. As amostras foram manualmente cortadas, em partes semelhantes, com dimensão de aproximadamente $0,3 \times 0,3$ cm e espessura média de $408 \mu\text{m}$. Procedendo-se como de praxe, antes da aplicação dos esmaltes, com auxílio de uma lixa, foram removidos aproximadamente $30 \mu\text{m}$ da face dorsal da estrutura ungueal e obtido seu espectro FTIR-PAS (face dorsal e ventral), além dos espectros dos esmaltes separadamente. Em seguida, foram aplicados $5 \mu\text{L}$ de esmalte sobre a face dorsal e após 30 minutos, avaliada a permeação deste na unha (figura 15).

Figura 15 - Diagrama esquemático para o estudo *ex vivo* da permeação dos esmaltes na estrutura ungueal.



4.6.3 Análise Estatística

Os resultados foram apresentados como média \pm erro padrão da média (E.P.M.). Os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA), seguida pelo teste de Tukey, considerando $P < 0,05$ como nível de significância.

4.7 AVALIAÇÃO DA ESTABILIDADE PRELIMINAR

Após o resultado das análises microbiológicas foram selecionadas as formulações que apresentaram o melhor desempenho para serem submetidas ao estudo de estabilidade preliminar.

As amostras foram embaladas em frasco de vidro bem vedado, cujo volume ocupado foi referente a um terço da capacidade da embalagem, para possibilitar trocas gasosas. A armazenagem se deu em ciclos de 24 horas a 4 ± 2 °C e 24 horas a 40 ± 2 °, durante 15 dias. Decorrido este tempo, houve nova avaliação quanto aos aspectos organolépticos e pH (BRASIL, 2004).

4.8 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA

Fragmentos de unha infectados com *T. mentagrophytes* e tratados com as formulações selecionadas foram submetidos a este procedimento, juntamente com outro somente infectado, como controle negativo. Tais fragmentos foram inicialmente fixados com soluções de formaldeído 3% (v/v), paraformaldeído 2% (v/v) e tampão cacodilato de sódio 0,1 M (pH=7,2) durante 1 hora, seguido de 3 lavagens (10 minutos cada) com o referido tampão. Posteriormente, as amostras passaram por tratamento com ósmio durante 1 hora, sendo lavadas, como anteriormente descrito, e desidratadas gradualmente em soluções alcoólicas (50, 60, 70, 80, 90 e 100% v/v). Tais amostras foram levadas ao ponto crítico em CO₂ (BALTEC CPD 030 Critical Point Dryer), montadas em *stubs* e revestidas com ouro (BALTEC SDC 050 Sputter Coater) e, por fim, analisadas sob Microscópio Eletrônico de Varredura FEI Quanta 200 (KOROISHI et al., 2010).

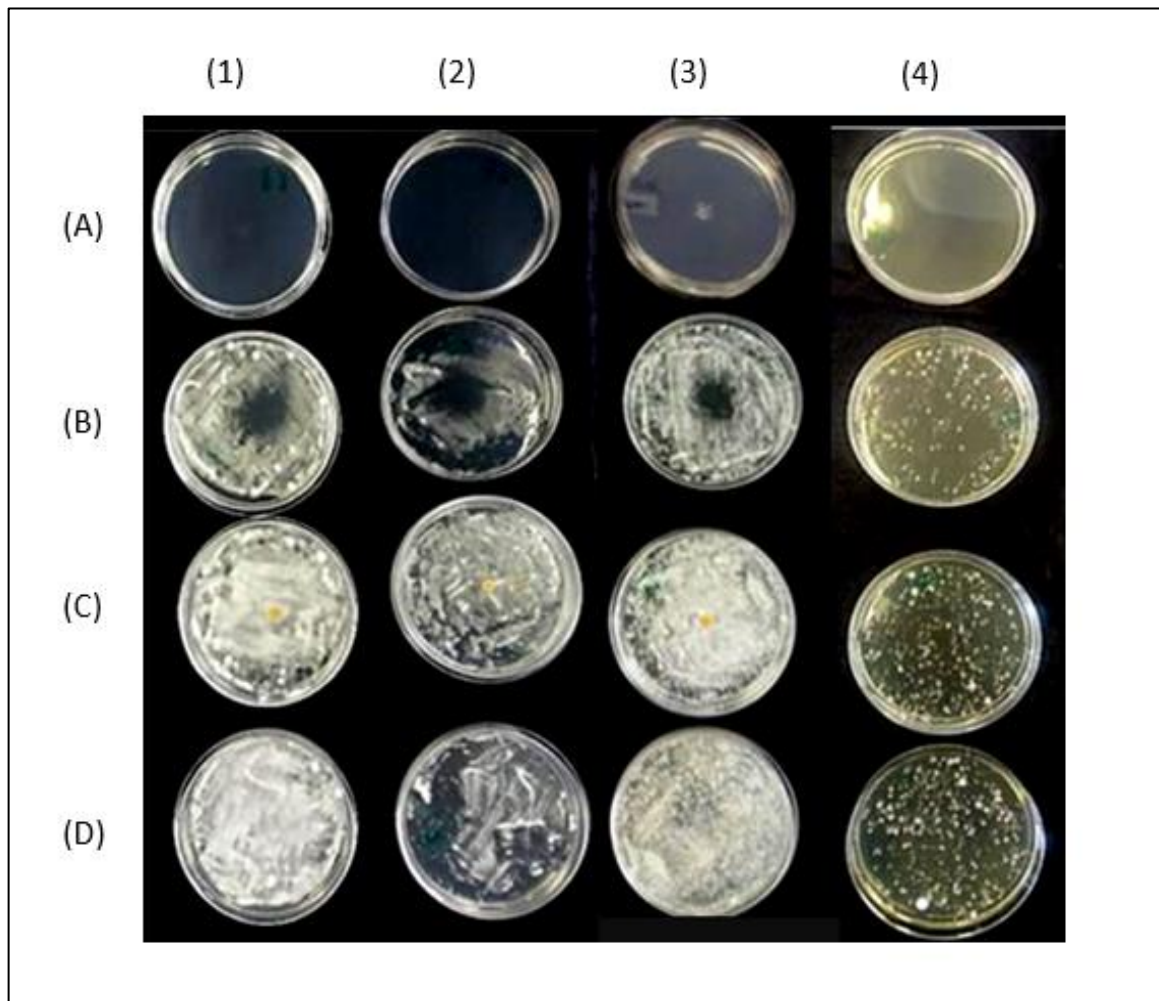
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 TESTES REALIZADOS COM OS PRINCÍPIOS ATIVOS

5.1.1 Teste de Disco-difusão

Os resultados obtidos a partir deste teste estão apresentados na Figura 16. Ao fim do período de incubação das placas, observou-se que OEO foi um ativo fortemente inibidor do crescimento fúngico, enquanto que OEA mostrou-se um inibidor moderado e, por fim, bio-NPAg não exibiu qualquer sinal de atividade inibitória, assim como o controle negativo.

Figura 16 – Teste de disco-difusão aplicado aos princípios ativos OEO (A), OEA (B) e bio-NPAg (C) frente aos dermatófitos *Tricophyton mentagrophytes* (1), *Tricophyton rubrum* (2), *Microsporum canis* (3) e *Microsporum gypseum* (4). Cultivos dos respectivos fungos foram usados como controle negativo (D).



A técnica de disco-difusão é comumente empregada na avaliação da atividade antimicrobiana de extratos e óleos essenciais de plantas. Caracteriza-se por ser um teste qualitativo simples e de baixo custo que possibilita estimar o grau de inibição do crescimento microbiano através da formação de um halo de inibição em torno do analito (KALEMBA, KUNICKA, 2003; SAAD, MULLER, LOBSTEIN, 2013).

A aplicação desta técnica para testar OEs encontra limitações, pois devido à volatilidade, o óleo tende a evaporar durante o tempo de incubação do teste, além de que pode apresentar dificuldade em difundir-se no ágar por conta de sua natureza lipofílica, o que faz com que a atividade antimicrobiana observada não seja totalmente confiável e até mesmo subestimada. Logo, devido aos entraves apresentados, recomenda-se utilizar o teste disco difusão apenas como uma forma de avaliação preliminar, recorrendo-se posteriormente a testes mais sofisticados para se obter resultados mais robustos em relação a este parâmetro (GOLUS et al., 2016; KALEMBA, KUNICKA, 2003; SAAD, MULLER, LOBSTEIN, 2013). Da mesma forma, no caso das bio-NPAg, a ausência de inibição também pode ser atribuída à dificuldade de difusão no ágar.

Conforme descrito anteriormente nos itens 2.3 e 2.4, os analitos em questão apresentam efeito antimicrobiano comprovado, inclusive, frente aos fungos aqui testados; contudo, tal efeito não pôde ser claramente evidenciado através deste ensaio. Logo, diante desta divergência, coube submeter os ativos ao teste de microdiluição em caldo para quantificar o efeito antimicrobiano de cada um deles.

5.1.2 Determinação das Concentrações Inibitória Mínima (CIM) e Fungicida Mínima (CFM)

Da execução das determinações, foram obtidos os valores apresentados nas Tabelas 2 e 3. Os resultados aqui expressos mostram claramente a capacidade inibitória de cada princípio ativo, antes não evidenciada pelo teste de disco-difusão, com destaque para as bio-NPAg.

A CIM para OEO situou-se entre 0,047 e 0,094%, enquanto que para OEA esteve entre 0,188 e 0,250%, atingindo valores ainda mais baixos para bio-NPAg, da ordem de 1,46 a $3,90 \times 10^{-3}\%$. Quanto aos valores de CFM, no caso de OEO estavam

compreendidos entre 0,063 e 0,208; já com OEA, obteve-se CFM=0,250% para *T. mentagrophytes*, CFM=0,125% para *T. rubrum* e para as espécies do gênero *Microsporium*, CFM >0,250%; por fim, com as bio-NPAg, os valores deste parâmetro foram da ordem de 10^{-4} , sendo maior que 0,250% para *T. mentagrophytes*.

Tabela 2 – Valor médio da concentração inibitória mínima \pm desvio padrão dos óleos essenciais de orégano (OEO) e alecrim (OEA) e nanopartículas de prata biogênicas (Bio-NPAg) frente a *T. mentagrophytes*, *T. rubrum*, *M. canis* e *M. gypseum*.

FUNGO	CIM (%)		
	OEO	OEA	Bio-NPAg
<i>T. mentagrophytes</i>	0,047 \pm 0,02	0,188 \pm 0,09	2,93x10 ⁻³ \pm 0,01
<i>T. rubrum</i>	0,047 \pm 0,02	0,188 \pm 0,09	1,46x10 ⁻³ \pm 0,00
<i>M. canis</i>	0,094 \pm 0,04	0,188 \pm 0,09	1,93x10 ⁻³ \pm 0,00
<i>M. gypseum</i>	0,063 \pm 0,00	0,250 \pm 0,00	3,90x10 ⁻³ \pm 0,00

Tabela 3 – Concentração fungicida mínima (CFM) dos óleos essenciais de orégano (OEO) e alecrim (OEA) e nanopartículas de prata biogênicas (Bio-NPAg) frente a *T. mentagrophytes*, *T. rubrum*, *M. canis* e *M. gypseum*.

FUNGO	CFM (%)		
	OEO	OEA	Bio-NPAg
<i>T. mentagrophytes</i>	0,133	0,250	> 0,25
<i>T. rubrum</i>	0,063	0,125	8,14x10 ⁻⁴
<i>M. canis</i>	0,208	> 0,250	< 1,95x10 ⁻³
<i>M. gypseum</i>	0,078	> 0,250	< 3,91x10 ⁻⁴

As propriedades antimicrobianas destes ativos encontram-se amplamente descritas na literatura. No caso dos OEs, sabe-se que esta propriedade é diretamente atrelada à sua composição, principalmente à presença de compostos fenólicos como carvacrol (no OEO) e derivados de carnosol e rosmanol (no OEA). Quanto à ação de NPAg, há evidências de que esteja baseada na liberação de íons Ag⁺ a partir de sua superfície (NIETO, ROS, CASTILLO, 2018; PRABHU, POULOSE, 2012; SAAD, MULLER, LOBSTEIN, 2013).

Segundo Fonseca (2011), o teste de susceptibilidade de *M. canis*, *M. gypseum*, *T. mentagrophytes* frente a OEO e OEA, gerou CIM de 0,3 a 3,0 % e 0,03 a 3,0%, respectivamente. No trabalho de Souza (2010), a CIM de OEO contra *T. rubrum* foi de 0,03%. Mousavi, Salari e Hadizadeh (2015) detectaram valores de CIM com NPAg de 0,02% para *M. canis*, 0,018% para *T. mentagrophytes* e 0,017% para *M. gypseum*. O fato de cada laboratório seguir um protocolo diferente para a realização de testes antimicrobianos associado às distintas origens dos ativos são os responsáveis por gerar resultados diversos de CIM e CFM, não havendo valores de referência para estes parâmetros.

5.1.3 Avaliação da Citotoxicidade

As concentrações capazes de inibir a viabilidade em até 50% (IC_{50/72h}) estão listadas na Tabela 4.

Tabela 4 – Índice de citotoxicidade obtido por meio de ensaio em MTT em linhagem de células VERO para OEO, OEA e bio-NPAg.

Ativo	IC _{50/72h} (%)
OEO	> 7,00
OEA	0,049
Bio-NPAg	1,33

A toxicidade dos OEs depende diretamente de sua composição, bem como da concentração em que são utilizados, sendo necessários testes toxicológicos para atestar efetivamente sua segurança. São capazes de penetrar facilmente na pele, conseguindo atingir a corrente sanguínea, contudo, são rapidamente metabolizados, não se acumulando no organismo e prontamente excretados na urina e nas fezes (HERMAN, HERMAN, 2015). Assim, sugere-se que estes sejam seguros à saúde do indivíduo, podendo ser incorporados em formulações de uso tópico.

Segundo estudo de Samberg, Oldenburg e Monteiro-Riviere (2010), da exposição de pele de porco frente a NPAg durante 14 dias, estas não foram capazes de atravessar a barreira da pele, sendo localizadas somente na camada superficial do estrato córneo, sem observação de sinais macroscópicos de irritação cutânea, com surgimento de inflamação e edema locais dose-dependentes.

Sendo assim, é possível inferir que estes ativos não são tóxicos e da aplicação na região periungueal (epiderme), não há potenciais riscos de danos à saúde do paciente.

5.2 TESTES REALIZADOS COM AS FORMULAÇÕES DE ESMALTE

5.2.1 Teste de Disco-difusão

Da incubação das formulações com *Tricophyton mentagrophytes*, FOO mostrou atividade inibitória pronunciada, enquanto que FOOA e FOAG exibiram atividade inibitória menos expressiva frente ao dermatófito (Figura 17). Já da realização do teste com *Tricophyton rubrum* e *Microsporum canis* (Figuras 18 e 19), somente FOO apresentou atividade inibitória, com total inibição do crescimento do último fungo. Por fim, no caso de *Microsporum gypseum*, a inibição pôde ser observada para FOO e FAAG, sendo maior para a primeira (Figura 20). Em geral, FOO foi a única formulação capaz de inibir o crescimento fúngico de todas as espécies testadas, além da formulação comercial utilizada como padrão comparativo (FP).

Figura 17 – Teste de disco-difusão aplicado às formulações FOO, FOA, FAG, FOOA, FAAG, FOAG e FOOAG frente a *Tricophyton mentagrophytes*, tendo FP como padrão comparativo e CT como controle negativo.

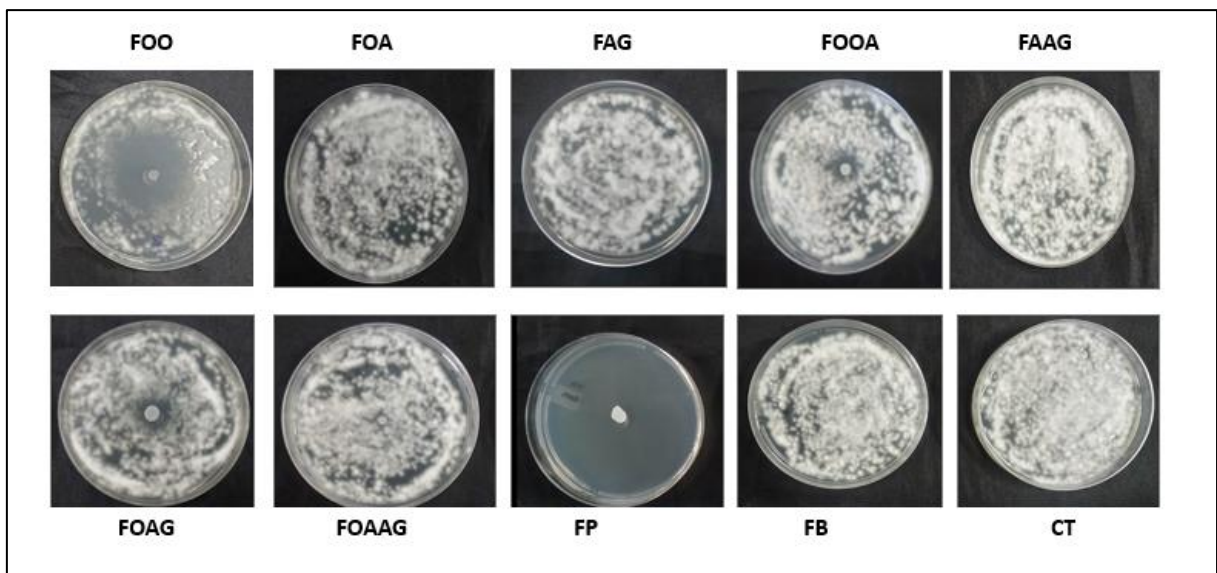


Figura 18 – Teste de disco-difusão aplicado às formulações FOO, FOA, FAG, FOOA, FAAG, FOAG e FOAAG frente a *Tricophyton rubrum*, tendo FP como padrão comparativo e CT como controle negativo.

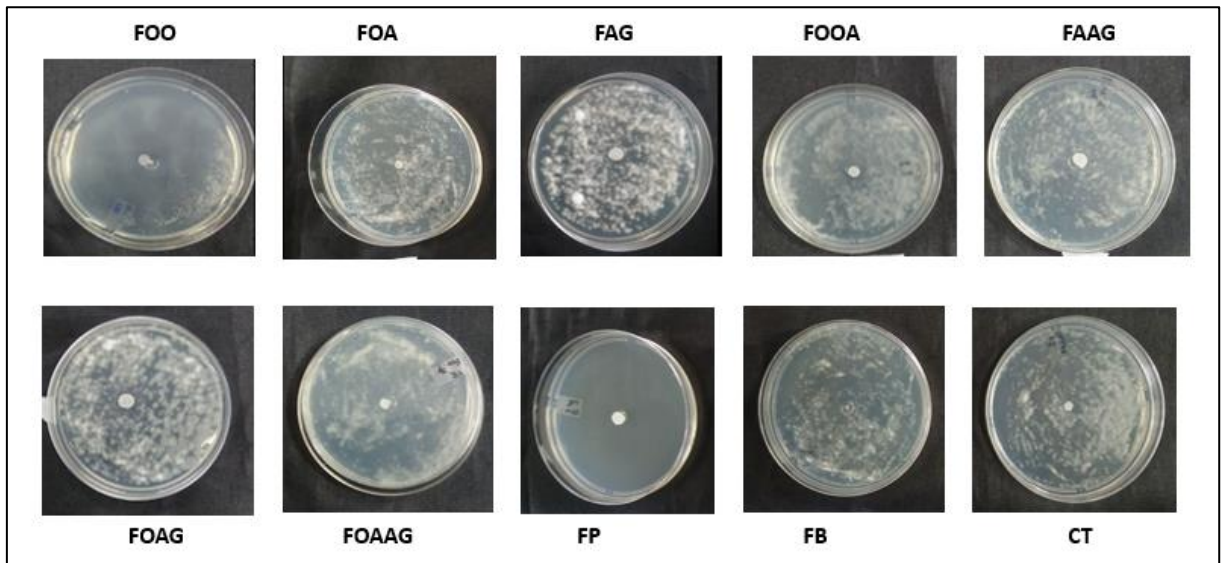


Figura 19 – Teste de disco-difusão aplicado às formulações FOO, FOA, FAG, FOOA, FAAG, FOAG e FOAAG frente a *Microsporum canis*, tendo FP como padrão comparativo e CT como controle negativo.

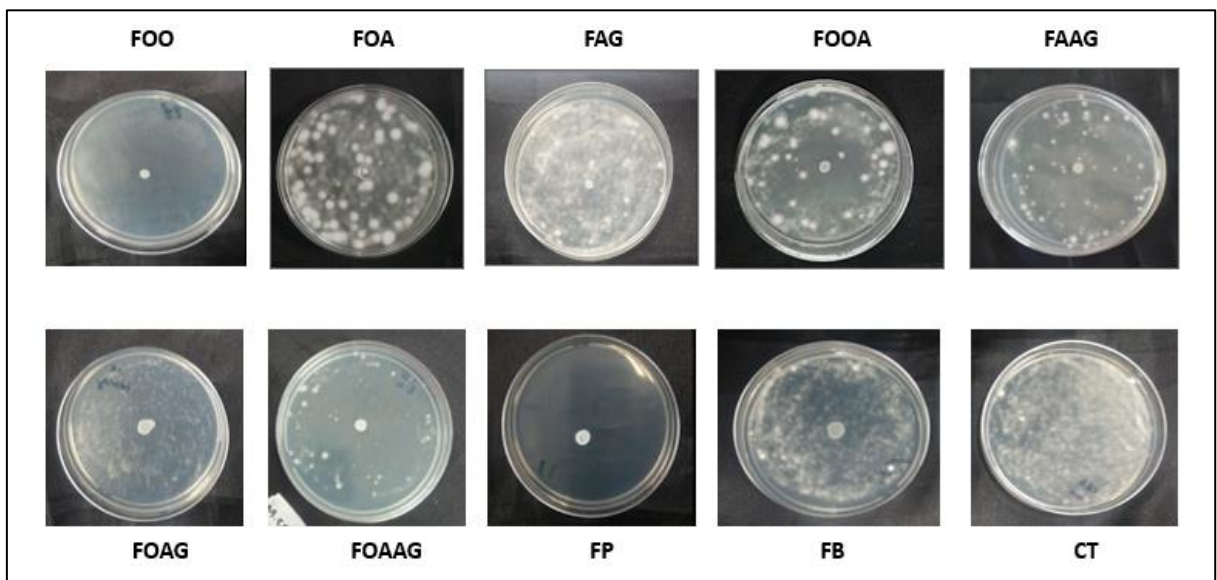
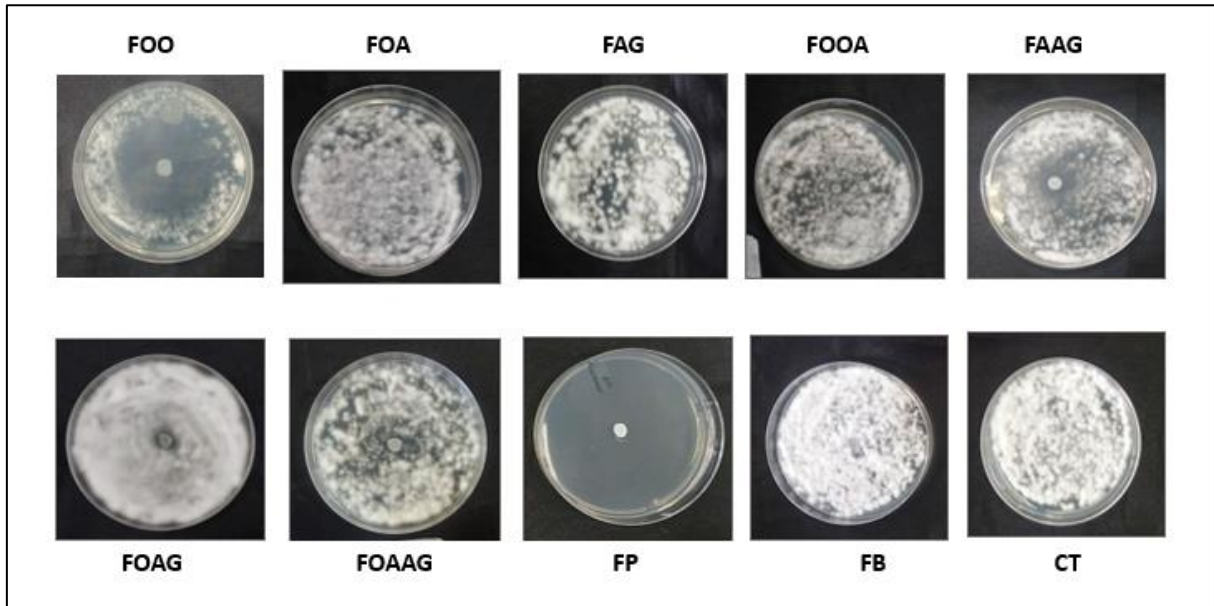


Figura 20 – Teste de disco-difusão aplicado às formulações FOO, FOA, FAG, FOOA, FAAG, FOAG e FOAAG frente a *Microsporium gypseum*, tendo FP como padrão comparativo e CT como controle negativo.



Assim como no caso dos princípios ativos, a realização deste teste com as formulações também encontrou limitações por conta da dificuldade de difusão das formulações no ágar, que pode ser atribuída ao veículo do esmalte, o que acaba por subestimar a atividade antimicrobiana destas formulações. Sendo assim, prosseguiu-se com a realização do teste de infecção ungueal, cujos resultados podem ser mais confiáveis visto que a aplicação dos esmaltes será feita diretamente em unhas, simulando assim as condições de um tratamento de onicomicose.

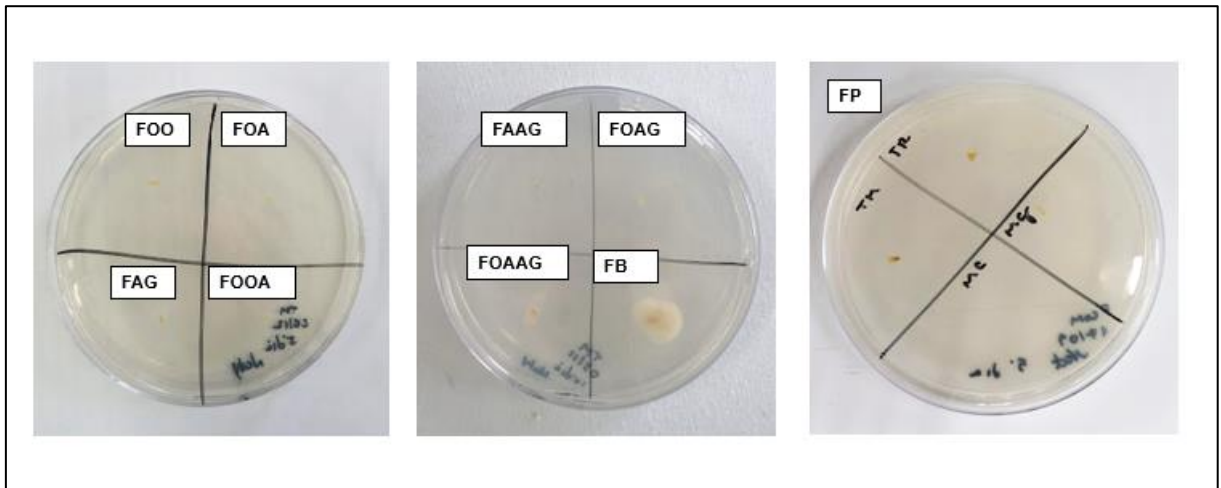
5.2.2 Teste de Infecção Ungueal

Este ensaio objetivou simular o tratamento das unhas de um indivíduo acometido por onicomicose por meio da aplicação das formulações, em dias alternados, durante um curto período de tempo (15 dias), verificando-se a eficácia por meio de cultura fúngica, negativa ou positiva, em meio de BDA. Os resultados de cultura encontram-se ilustrados no Quadro 2.

Com apenas 5 dias de tratamento, as formulações já apresentaram eficácia, conforme exemplificado pela cultura negativa de unhas infectadas com *T.*

mentagrophytes (Figura 21). FOO, FOOA e FOAG foram as únicas capazes de inibir o crescimento de todos os patógenos desde o 5º até o 15º dia de tratamento, assim como a formulação comercial (FP), estando aptas à formulação final do produto.

Figura 21 – Cultura de fragmentos de unhas infectadas com *Tricophyton mentagrophytes* e tratadas com todas as formulações durante 5 dias.



Quadro 2 – Tratamento de unhas infectadas com *T. mentagrophytes* (TM), *Tricophyton rubrum* (TR), *Microsporum canis* (MC) e *Microsporum gypseum* (MG) com todas as formulações durante 15 dias.

Formulação	Dias de tratamento	TM	TR	MC	MG
FOO	5				
	10				
	15				
FOA	5				
	10				
	15				
FAG	5				
	10				
	15				
FOOA	5				
	10				
	15				
FAAG	5				
	10				
	15				
FOAG	5				
	10				
	15				
FOAAG	5				
	10				
	15				
FP	5				
	10				
	15				
FB	5				
	10				
	15				



Cultura positiva

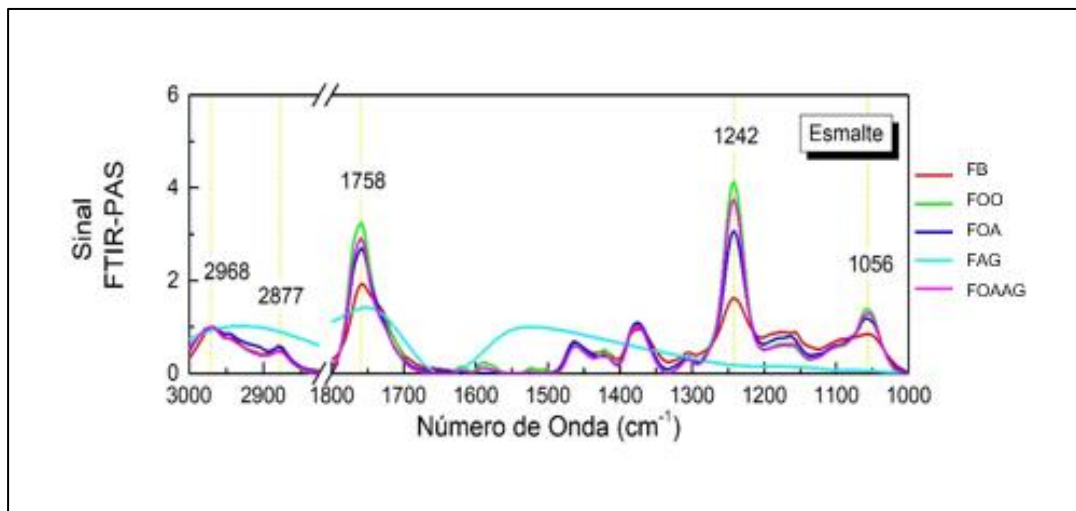


Cultura negativa

5.2.3 Avaliação da Permeação das Formulações na Unha

Os espectros de absorção FTIR-PAS de FOO, FOA, FAG, FOAAG e FB antes de serem aplicados sobre a unha, obtidos na região de 3000 a 1000 cm^{-1} , apresentaram padrões espectrais semelhantes com variações de intensidade das bandas (Figura 22). Os principais picos identificados são atribuídos a ligações de CH em 2968 e 2877 cm^{-1} , ligações de C=O em 1758 cm^{-1} , ligações de C-O em 1242 cm^{-1} e ligações de C-O-C em 1056 cm^{-1} (GOUDARZI et al., 2016; LUO et al., 2019; POLA et al., 2016). A detecção destas bandas características na face ventral, após a aplicação tópica das formulações na face dorsal, indica que ocorreu a permeação ao longo da extensão da unha (Figura 23).

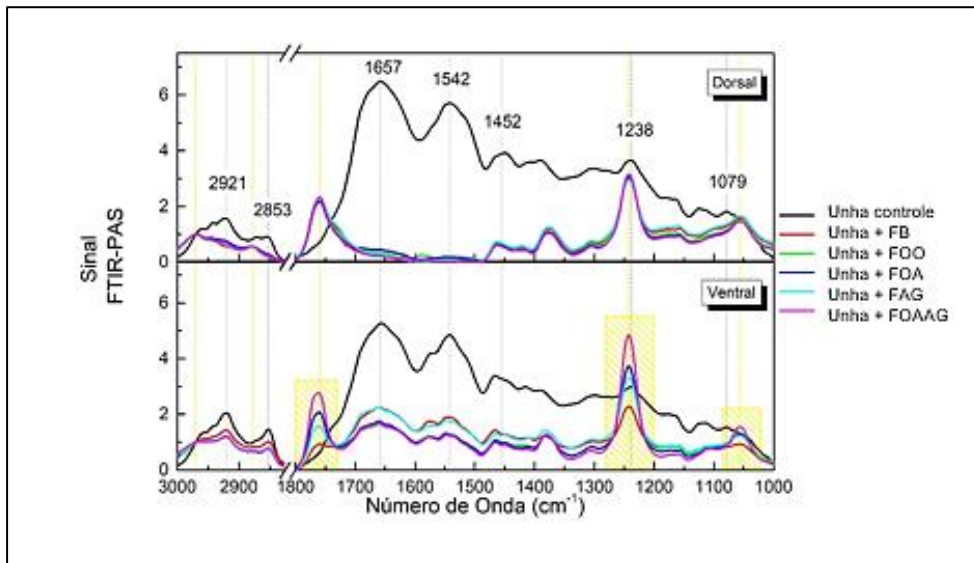
Figura 22 - Espectros de absorção FTIR-PAS das formulações FOO, FOA, FAG, FOAAG e FB.



A Figura 23 mostra os espectros de absorção FTIR-PAS das faces ventral e dorsal da unha sem esmalte (controle) e após 30 min do contato com as formulações (FOO, FOA, FAG, FOAAG, FB). A unha controle apresenta picos centrados em 2921 e 2853 cm^{-1} atribuídos ao alongamento de CH_2 de lipídeos; em 1657, 1542 e 1452 e 1238 cm^{-1} respectivos às bandas I, II e III do grupo funcional amida e em 1079 cm^{-1} do esqueleto C-C de DNA (LAGO, 2017; VEIGA et al., 2018). Após 30 min do contato da unha com os esmaltes, os espectros apresentam um aumento de intensidade na região dos picos 1758, 1242 e 1079 cm^{-1} , característicos da absorção dos esmaltes.

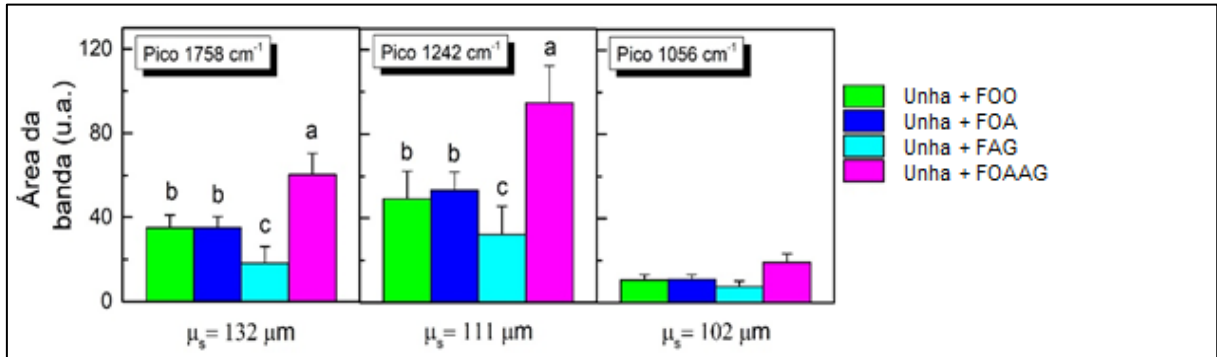
A presença dessas bandas na face ventral da unha demonstra a capacidade de permeação dos esmaltes.

Figura 23 - Espectros de absorção FTIR-PAS da unha sem esmalte (controle) e após 30 minutos de contato com as formulações FB, FOO, FOA, FAG e FOAAG.



Para quantificar a permeação na face ventral foi feita a integração da área sob a curva de absorção característica dos esmaltes (região das bandas centradas em 1758, 1242 e 1079 cm^{-1}) subtraída da área da unha controle (Figura 24). Os resultados mostram que FOAAG apresenta uma permeação significativamente maior a partir da espessura de 111 μm ; já FOO e FOA não apresentam permeação significativamente diferente e FAG mostrou permeação significativamente menor em relação aos outros esmaltes.

Figura 24 - Área sob a curva obtida por meio de integral para as bandas centradas em 1758, 1242 e 1079 cm^{-1} , subtraída a área da unha controle nessa região. Cada valor representa a média \pm E.P.M de 10 unhas por grupo. *One-way ANOVA* seguido do teste de Tukey, com $p < 0,05$.



A permeação de um composto na placa ungueal pode ser influenciada por suas propriedades físico-químicas (tamanho, carga e lipofilicidade da molécula), bem como pelas propriedades da formulação (natureza do veículo, pH, concentração do composto), da unha (grau de hidratação e estágio da doença) e também pelas interações com a rede de queratina presente na unha (MURDAN, 2008).

A propriedade mais importante para se estabelecer a permeação de um agente antifúngico é seu peso molecular, pois quanto maior este for, menor será sua permeação. A natureza lipofílica/hidrofílica também é uma propriedade importante e está relacionada ao peso molecular, uma vez que normalmente o aumento da lipofilicidade acompanha o aumento no peso molecular dentro de uma série de compostos da mesma classe (ex: n-álcoois), resultando na diminuição da capacidade de permeação do agente. Como os OEs são compostos por moléculas de baixo peso molecular, sua permeação é facilitada na placa ungueal (MURDAN, 2008; FLORES, BECK, DA SILVA, 2016).

A presença ou ausência de carga na estrutura do agente também constitui um parâmetro relevante, considerando-se que os não-iônicos chegam a ser até 10 vezes mais permeáveis do que os correspondentes ionizados. Neste caso, a baixa permeabilidade é possivelmente devida a dois fatores: (1) o aumento no tamanho da estrutura ocasionado pela hidratação da espécie ionizada e (2) a repulsão eletrostática entre as cargas da espécie e da queratina, caso sejam iguais (MURDAN, 2008). Assim, pelo fato de as bio-NPAg liberarem íons Ag^+ , estes podem estar sofrendo

hidratação, justificando-se assim a baixa permeação apresentada pela formulação FAG.

Unhas acometidas por onicomicose tendem a se tornar mais espessas, o que faz com que o trajeto de permeação do ativo em direção ao leito ungueal seja aumentado; entretanto, ocorre aumento na porosidade delas, conseqüentemente aumentando este parâmetro. O grau de hidratação da unha também parece facilitar a permeação ungueal (MCAULEY et al., 2016; MURDAN, 2008; TOSTI, VLAHOVIC, ARENAS, 2017).

A permeação pode ser melhorada pelo uso de métodos físicos, como lixamento, *lasers* e terapia fotodinâmica, ou ainda de agentes queratolíticos, como ureia, ácido tioglicólico e ácido salicílico. O método mais simples e comumente usado consiste em lixar a porção infectada antes da aplicação do esmalte, reduzindo assim a barreira que os ativos enfrentam para atingir as camadas mais profundas da unha e conseqüentemente melhorando o sucesso da terapia tópica (BHUPTANI, DESHPANDE, PATRAVALE, 2016; MURDAN, 2008).

Sendo assim, o lixamento prévio também será adotado como procedimento de praxe antes da aplicação das formulações nas unhas infectadas.

5.3 SELEÇÃO DAS FORMULAÇÕES DE ESMALTE

OEO e bio-NPAg foram os ativos que desempenharam melhor atividade antimicrobiana frente aos microrganismos testados; logo as formulações contendo OEA foram descartadas, restando somente FOO, FAG e FOAG. Porém, como FAG teve a permeação mais baixa, FOO e FOAG foram selecionadas como aptas a prosseguir com os estudos, sendo então submetidas às caracterizações farmacotécnicas e de estabilidade.

5.4 CARACTERIZAÇÃO FARMACOTÉCNICA DAS FORMULAÇÕES SELECIONADAS

5.4.1 Teste de Centrifugação

A centrifugação objetiva submeter a amostra a uma condição de estresse, simulando um aumento na força da gravidade por conta da alta rotação a que a amostra é submetida; logo, este teste permite antecipar instabilidades que possam futuramente sobrevir ao produto, manifestadas na forma de sedimentação, separação de fases ou coalescência (BRASIL, 2007).

Da realização da análise visual ao fim do procedimento, observou-se que tanto as formulações quanto o controle mantiveram um aspecto homogêneo, ausente de quaisquer indícios de separação de fases ou precipitação, isto é, todas elas atestaram estabilidade e estão aptas a serem submetidas às caracterizações subsequentes.

5.4.2 Ensaios organolépticos

Quanto às características organolépticas da formulação controle (FB), foi possível observar que esta apresentou-se sob a forma de um líquido homogêneo incolor, com odor característico de acetato de etila. Já as formulações FOO e FOAG diferiam de FB em relação à cor e ao odor, sendo a primeira levemente amarelada por conta do OEO e a segunda, marrom devido à presença das bio-NPAg. Ambas apresentaram cheiro característico do referido óleo e mantiveram o mesmo aspecto homogêneo do controle.

O aspecto sensorial de um produto representa um parâmetro de avaliação de qualidade, implicando diretamente em sua aceitação pelo consumidor. As diferenças sensoriais observadas em diversos cosméticos são decorrentes do tipo de formulação, bem como de seus constituintes e embalagem usada para seu acondicionamento (ISAAC et al., 2012; VIEIRA, 2015). Sendo assim, como o produto em questão será utilizado com fim terapêutico, ao invés de estético, não há necessidade de adicionar pigmento à formulação.

5.4.3 Ensaios Físico-químicos

5.4.3.1 Determinação do pH

Feita a determinação, o pH de cada formulação encontra-se listado na Tabela 5. Em geral, os valores mostraram-se próximos entre si e compatíveis com o valor observado para a placa ungueal, que é de aproximadamente 5,0 (MURDAN, MILCOVICH, GORIPARTHI, 2011).

Tabela 5 – Valores de pH das formulações FOO, FOAG e FB a 25 °C.

Formulação	pH (25 °C)
FOO	4,0
FOAG	4,4
FB	4,4

5.4.3.2 Avaliação da densidade

Tal análise foi embasada na relação entre as densidades do analito e da água à temperatura de 20 °C. Realizada a determinação, os valores obtidos estão listados na Tabela 6.

Tabela 6 – Valores de densidade relativa \pm desvio padrão das formulações FOO, FOAG e FB a 20 °C

Formulação	Densidade (g cm ⁻³)
FOO	9,99 \pm 0,07
FOAG	10,1 \pm 0,01
FB	9,91 \pm 0,004

Sabendo-se que a densidade é influenciada pela composição da amostra e que cada formulação conta com ingredientes distintos, daí justifica-se a diferença observada nos valores desta propriedade (CÉSAR, DE PAOLI, DE ANDRADE, 2004).

5.4.3.3 Análise do tempo de secagem

Segundo Joshi, Sharma e Pathak (2015), o tempo necessário para a formação do filme de esmalte é de cerca de 1 a 2 minutos, sendo assim, os valores registrados na Tabela 6 estão situados dentro da faixa de referência. No caso de FOO, a presença de OEO em sua composição não representa uma barreira à secagem, uma vez que óleos essenciais são facilmente volatilizados. Já para FOAG a presença da solução coloidal de bio-NPAG pode estar retardando a evaporação do solvente e consequentemente a secagem da formulação.

Tabela 7 – Valores médios \pm desvio padrão dos tempos de secagem das formulações FOO, FOAG e FB.

Formulação	Tempo médio de secagem \pm D.P (s)
FOO	59,45 \pm 1,98
FOAG	90,30 \pm 7,81
FB	74,06 \pm 2,21

5.5 AVALIAÇÃO DA ESTABILIDADE PRELIMINAR

Semelhantemente ao teste de centrifugação, o estudo da estabilidade preliminar também visa à antecipação de futuras instabilidades, porém o faz por meio da submissão da amostra a condições extremas de temperatura, orientando a seleção daquelas mais aptas à formulação final do produto (BRASIL, 2004).

Da observação das amostras ao fim do estudo, constatou-se que as mesmas ainda se mantiveram homogêneas, sem quaisquer de sinais de separação de fases ou precipitação, atestando assim a estabilidade delas mesmo frente ao estresse a que foram submetidas. As características organolépticas permaneceram idênticas às relatadas anteriormente (item 5.4.2), apresentando pH de 4,1 para todas as formulações, valor não muito discrepante dos apresentados na Tabela 5.

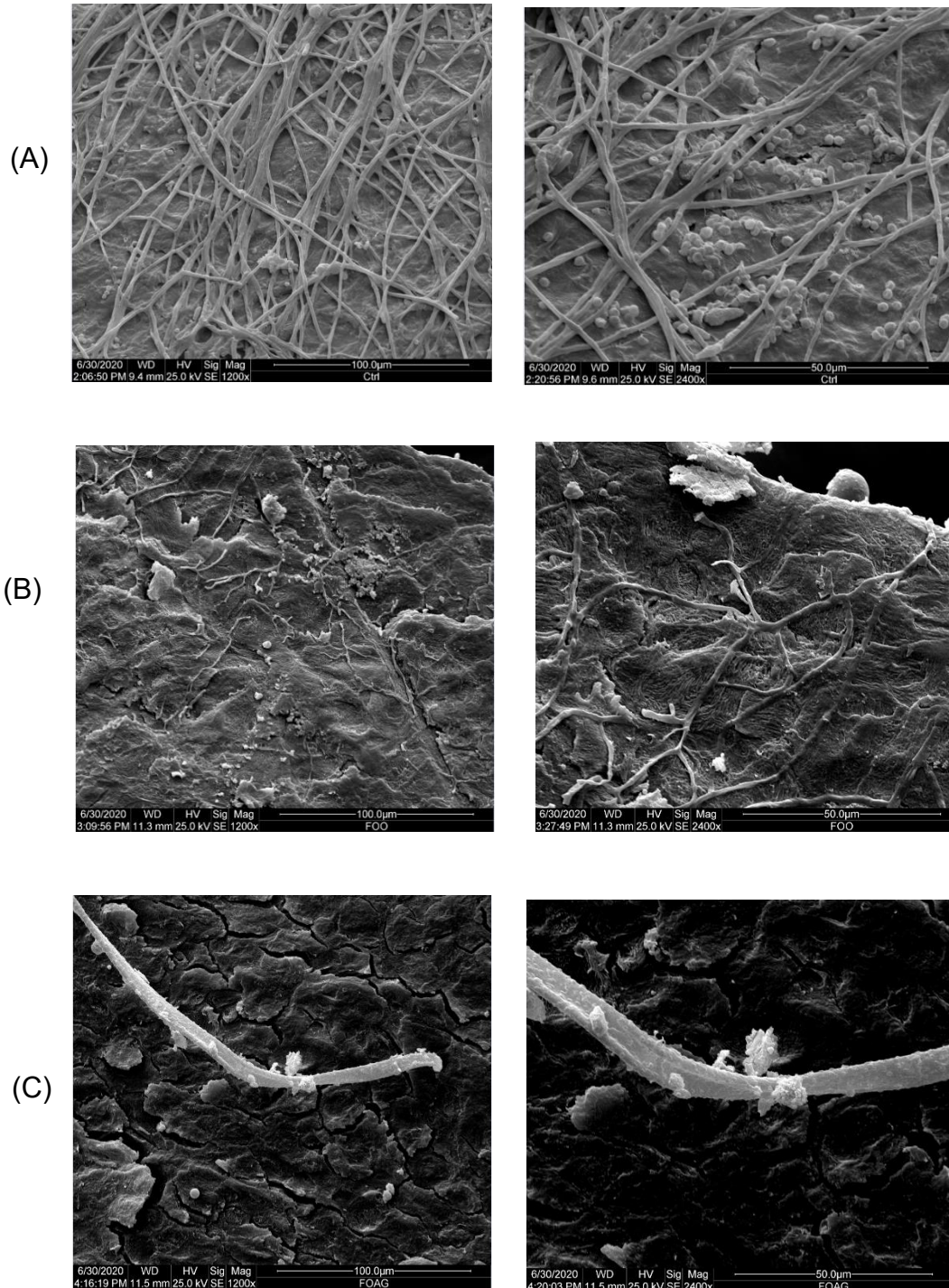
5.6 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA

Com a submissão das amostras de unha à análise por microscopia eletrônica de varredura foram obtidas as imagens reunidas na Figura 25.

Em relação ao controle (Figura 25 A), as imagens do tratamento com FOO e FOAG (Figuras 24 B e 24 C, respectivamente) evidenciaram claramente a diminuição no número de hifas presentes na unha, atestando a eficiência das formulações quanto à inibição do crescimento fúngico. No caso da última, fica evidente a alteração na morfologia da hifa, que passa a ter aspecto achatado em decorrência do extravasamento do conteúdo intracelular ocasionado pela interação de OEO e bio-NPAg com constituintes da membrana celular do patógeno, provocando a alteração da permeabilidade desta membrana e conseqüentemente comprometendo sua integridade (PRABHU, POULOSE, 2012; RAI et al., 2017).

Segundo INOUE et al. (2006), as imagens de MEV da exposição de *Tricophyton mentagrophytes* ao vapor de OEO indicaram hifas rompidas, sendo que após 4 horas de tratamento, estas mostraram-se retorcidas e com superfícies enrugadas, e após 24 h, tais hifas estavam colapsadas. Já no trabalho de Bocate et al. (2019), a exposição de *Aspergillus ochraceus* às NPAg a $4 \mu\text{g mL}^{-1}$ resultou em uma redução pronunciada na germinação de esporos e na danificação da célula fúngica, com formação de hifas curtas e não ramificadas.

Figura 25 – Imagens de microscopia eletrônica de varredura de unhas infectadas com *Tricophyton mentagrophytes* sem tratamento (I) e tratadas com FOO (II) e FOAG (III) durante 15 dias.



6 CONCLUSÃO

Os testes antimicrobianos evidenciaram o bom desempenho de OEO e bio-NPAG frente à inibição do crescimento microbiano e o teste de citotoxicidade atestou a inocuidade destes ativos. Das 7 formulações preparadas, FOO e FOAG foram as selecionadas como candidatas à formulação final do esmalte antifúngico. Ambas foram eficientes na inibição do crescimento de hifas de *T. mentagrophytes* de acordo com as imagens de MEV, atestando estabilidade, pH compatível com o da região ungueal (aproximadamente 5,0) e tempo de secagem abaixo de 2 minutos, podendo então ser utilizadas como nova alternativa terapêutica no tratamento da onicomicose.

REFERÊNCIAS

ABBASI, Elham et al. Silver nanoparticles: synthesis methods, bio-applications and properties. **Critical reviews in microbiology**, v. 42, n. 2, p. 173-180, 2016.

AHMAD, Shabir et al. Green nanotechnology: a review on green synthesis of silver nanoparticles—an ecofriendly approach. **International journal of nanomedicine**, v. 14, p. 5087, 2019.

ALEXOPOULOS, Athanasios et al. Mode of antimicrobial action of Origanum vulgare essential oil against clinical pathogens. **Current Research in Nutrition and Food Science Journal**, v. 5, n. 2, p. 109-115, 2017.

ANDRADE, Joana M. et al. Rosmarinus officinalis L.: an update review of its phytochemistry and biological activity. **Future science OA**, v. 4, n. 4, p. FSO283, 2018.

BARBIERI, Cinzia; BORSOTTO, Patrizia. Essential oils: market and legislation. **EI-Shemy, H. Potential of Essential Oils, IntechOpen**, p. 107-127, 2018.

BARBOSA, Lidiane Nunes et al. Proteomic analysis and antibacterial resistance mechanisms of Salmonella Enteritidis submitted to the inhibitory effect of Origanum vulgare essential oil, thymol and carvacrol. **Journal of Proteomics**, v. 214, p. 103625, 2020.

BASWAN, Sudhir et al. Understanding the formidable nail barrier: a review of nail microstructure, composition and diseases. **Mycoses**, v. 60, n. 5, p. 284-295, 2017.

BENSON, H.A.E. et al. **Cosmetic formulation: principles and practice**. Boca Raton: CRC Press, 2019.

BEUSCHER, Tara L.; KELECHI, Teresa J. Onychomycosis: Diagnosis, Treatment, and Prevention. **Journal of Wound Ostomy & Continence Nursing**, v. 46, n. 4, p. 333-335, 2019.

BHATTA, Anil Kumar; KEYAL, Uma; WANG, Xiu Li. Photodynamic therapy for onychomycosis: A systematic review. **Photodiagnosis and photodynamic therapy**, v. 15, p. 228-235, 2016.

BHATTA, Anil Kumar et al. A review of the mechanism of action of lasers and photodynamic therapy for onychomycosis. **Lasers in medical science**, v. 32, n. 2, p. 469-474, 2017.

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, 2016.

BITEW, Adane; WOLDE, Sinknesh. Prevalence, risk factors, and spectrum of fungi in patients with onychomycosis in Addis Ababa, Ethiopia: a prospective study. **Journal of tropical medicine**, v. 2019, 2019.

BOCATE, Karla Paiva et al. Antifungal activity of silver nanoparticles and simvastatin against toxigenic species of *Aspergillus*. **International journal of food microbiology**, v. 291, p. 79-86, 2019.

BODMAN, Mayron A.; KRISHNAMURTHY, Karthik. **Onychomycosis**. 2019. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK441853/>>. Acesso em: 22 abr. 2020.

BODMAN, Myron. **Keys to managing severe onychomycosis**. 2013. Disponível em: <<https://www.podiatrytoday.com/keys-managing-severe-onychomycosis>>. Acesso em: 10 maio 2020.

BRASIL, Ministério da Saúde, Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Guia de estabilidade de Produtos Cosméticos**. Brasília: ANVISA, 2004.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Guia de controle de qualidade de produtos cosméticos**. Brasília: Anvisa, 2007, 130 p.

BRUNS, R. E.; NETO, B. B.; SCARMÍNIO, I. S. Como fazer experimentos. **Editora da Unicamp, Campinas**, 2001.

BUTNARIU, Monica; SARAC, Ioan. Essential oils from plants. **Journal of Biotechnology and Biomedical Science**, v. 1, n. 4, p. 35, 2018.

CAMPOY, Sonia; ADRIO, José L. Antifungals. **Biochemical pharmacology**, v. 133, p. 86-96, 2017.

CÉSAR, Janaína; DE PAOLI, Marco-Aurélio; DE ANDRADE, João Carlos. A determinação da densidade de sólidos e líquidos. **Revista Chemkeys**, n. 7, p. 1-8, 2004.

CHAN, John K. C. The wonderful colors of the hematoxylin–eosin stain in diagnostic surgical pathology. **International journal of surgical pathology**, v. 22, n. 1, p. 12-32, 2014.

CLSI. **Method for antifungal disk-diffusion susceptibility test of yeasts; aproved guideline**. 2 ed. Documento M44-A2. CLSI, Wayne, 2009.

CLSI. **Reference method for broth microdilution antifungal susceptibility test of yeasts; aproved standard**. 3 ed. Documento M27-A3. CLSI, Wayne, 2008.

CUI, Haiying et al. Antibacterial mechanism of oregano essential oil. **Industrial Crops and Products**, v. 139, p. 111498, 2019.

DEL ROSSO, James Q. The role of topical antifungal therapy for onychomycosis and the emergence of newer agents. **The Journal of clinical and aesthetic dermatology**, v. 7, n. 7, p. 10, 2014.

DIAS, Daniele Toniolo et al. Thermal characterization in vitro of human nail: photoacoustic study of the aging process. **Photochemistry and photobiology**, v. 83, n.5, p. 1144-1148, 2007.

DUBLJANIN, Eleonora et al. Epidemiology of onychomycosis in Serbia: a laboratory-based survey and risk factor identification. **Mycoses**, v. 60, n. 1, p. 25-32, 2017.

DURÁN, Nelson et al. Nanotoxicologia de nanopartículas de prata: Toxicidade em animais e humanos. **Química Nova**, v. 42, n. 2, p. 206-213, 2019.

DUTRA, Tatiane Viana et al. Bioactivity of oregano (*Origanum vulgare*) essential oil against *Alicyclobacillus* spp. **Industrial Crops and Products**, v. 129, p. 345-349, 2019.

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, 2013.

EL GENDY, Sherein G.; SEDDEK, Nermien H.; MOHAMMED, Shereen M. Activity of some natural oils on dermatophytes isolated from Assuit University hospitals. **The Egyptian Journal of Medical Microbiology**, v. 38, n. 103, p. 1-7, 2016.

ELIAS, Rebecca et al. Antifungal activity, mode of action variability, and subcellular distribution of coumarin-based antifungal azoles. **European journal of medicinal chemistry**, v. 179, p. 779-790, 2019.

FLORES, Fernanda C.; BECK, Ruy C.R; DA SILVA, Cristiane de B. Essential oils for treatment for onychomycosis: a mini-review. **Mycopathologia**, v. 181, n. 1-2, p. 9-15, 2016.

FONSECA, Anelise Oliveira da Silva. **Ação antifúngica dos óleos essenciais de *Origanum vulgare* e *Rosmarinus officinalis* frente a isolados de *Pythium insidiosum* e Dermatofitos**. 2011. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2011.

GE, Liangpeng et al. Nanosilver particles in medical applications: synthesis, performance, and toxicity. **International journal of nanomedicine**, v. 9, p. 2399, 2014.

GIAVINI, E.; MENEGOLA, E. Are azole fungicides a teratogenic risk for human conceptus?. **Toxicology Letters**, v. 198, n. 2, p. 106-111, 2010.

GOLUS, J. et al. The agar microdilution method—a new method for antimicrobial susceptibility testing for essential oils and plant extracts. **Journal of applied microbiology**, v. 121, n. 5, p. 1291-1299, 2016.

GUPTA, Aditya K.; PAQUET, Maryse; SIMPSON, Fiona C. Therapies for the treatment of onychomycosis. **Clinics in dermatology**, v. 31, n. 5, p. 544-554, 2013.

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, 2017.

HAMMER, K. A.; CARSON, C. F.; RILEY, T. V. In vitro activity of *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil against dermatophytes and other filamentous fungi. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 50, n. 2, p. 195-199, 2002.

HASSANI, Faezeh Vahdati; SHIRANI, Kobra; HOSSEINZADEH, Hossein. Rosemary (*Rosmarinus officinalis*) as a potential therapeutic plant in metabolic syndrome: a review. **Naunyn-Schmiedeberg's archives of pharmacology**, v. 389, n. 9, p. 931-949, 2016.

HERMAN, Anna; HERMAN, Andrzej P. Essential oils and their constituents as skin penetration enhancer for transdermal drug delivery: a review. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 67, n. 4, p. 473-485, 2015.

HU, Fei et al. Comparison of antifungal activity of essential oils from different plants against three fungi. **Food and Chemical Toxicology**, v. 134, p. 110821, 2019.

HUMPHREYS, Emily. **Effects of rosemary extract on colon cancer cells.** Disponível em: < <https://www.thermofisher.com/blog/proteomics/effects-of-rosemary-extract-on-colon-cancer-cells/>>. Acesso em: 21 ago. 2020.

INOUYE, Shigeharu et al. The vapor activity of oregano, perilla, tea tree, lavender, clove, and geranium oils against a Trichophyton mentagrophytes in a closed box. **Journal of Infection and Chemotherapy**, v. 12, n. 6, p. 349-354, 2006.

IRAVANI, Siavach et al. Synthesis of silver nanoparticles: chemical, physical and biological methods. **Research in pharmaceutical sciences**, v. 9, n. 6, p. 385, 2014.

ISAAC, Vera et al. Análise sensorial como ferramenta útil no desenvolvimento de cosméticos. **Journal of Basic and Applied Pharmaceutical Sciences**, v. 33, n. 4, 2012.

JOSHI, Monika; SHARMA, Vijay; PATHAK, Kamla. Matrix based system of isotretinoin as nail lacquer to enhance transungual delivery across human nail plate. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 478, n. 1, p. 268-277, 2015.

KAČÁNIOVÁ, Miroslava et al. Antimicrobial and antiradicals activity of *Origanum vulgare* L. and *Thymus vulgaris* essential oils. **Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences**, v. 2019, p. 263-271, 2019.

KALEMBA, D. A. A. K.; KUNICKA, A. Antibacterial and antifungal properties of essential oils. **Current medicinal chemistry**, v. 10, n. 10, p. 813-829, 2003.

KREIJKAMP-KASPERS, Sanne et al. Oral antifungal medication for toenail onychomycosis. **Cochrane Database of Systematic Reviews**, n. 7, 2017.

KOROISHI, Andrea Mayumi. et al. Antifungal activity and nail permeation of nail lacquer containing Piper regnellii (Miq.) C. CD. var. pallescens (C. DC.) Yunck (Piperaceae) Leave Extracts and Derivatives. **Molecules**, v. 15, p. 3920-3931, 2010.

LAGO, Guilherme Lopes do et al. **Hidrogéis termo e pH-responsivos baseados em queratina e PNIPAAm**. 2017. Dissertação (Mestrado em Química) – Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2017.

LAUBÉ, Florian et al. Physicochemical investigations of native nails and synthetic models for a better understanding of surface adhesion of nail lacquers. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 131, p. 208-217, 2019.

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, 2019.

LOPES, Graciliana; PINTO, Eugénia; SALGUEIRO, Lígia. Natural products: an alternative to conventional therapy for dermatophytosis?. **Mycopathologia**, v. 182, n. 1-2, p. 143-167, 2017.

LUO, X.; SEDMAN, J.; ISMAIL, A. A. Microencapsulation of oregano (*Origanum vulgare* L.), rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) and sage (*Salvia officinalis* L.) essential oils in β -lactoglobulin. **Journal of Food Science & Technology**, v.4, n. 9, p. 970-985, 2019.

MABEY, Thomas et al. Bacteria and nanosilver: the quest for optimal production. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 39, n. 2, p. 272-287, 2019.

MADDY, Austin John; TOSTI, Antonella. Hair and nail diseases in the mature patient. **Clinics in Dermatology**, v. 36, n. 2, p. 159-166, 2018.

MARAKI, Sofia; MAVROMANOLAKI, Viktoria Eirini. Epidemiology of onychomycosis in Crete, Greece: a 12-year study. **Mycoses**, v. 59, n. 12, p. 798-802, 2016.

MAZU, Tryphon et al. The mechanistic targets of antifungal agents: an overview. **Mini reviews in medicinal chemistry**, v. 16, n. 7, p. 555-578, 2016.

MCAULEY, W. J. et al. An investigation of how fungal infection influences drug penetration through onychomycosis patient's nail plates. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 102, p. 178-184, 2016.

MOUSAVI, Seyyed Amin Ayatollahi; SALARI, Samira; HADIZADEH, Sanaz. Evaluation of antifungal effect of silver nanoparticles against *Microsporum canis*, *Trichophyton mentagrophytes* and *Microsporum gypseum*. **Iranian Journal of Biotechnology**, v. 13, n. 4, p. 38, 2015.

MURDAN, Sudaxshina. Enhancing the nail permeability of topically applied drugs. **Expert opinion on drug delivery**, v. 5, n. 11, p. 1267-1282, 2008.

MURDAN, S.; MILCOVICH, G.; GORIPARTHI, G. S. An assessment of the human nail plate pH. **Skin pharmacology and physiology**, v. 24, n. 4, p. 175-181, 2011.

NAKAMURA, Robertha; BARAN, Robert. **Doenças da unha**. 2.ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2018.

NAZZARO, Filomena et al. Essential oils and antifungal activity. **Pharmaceutics**, v. 10, n. 4, p. 86, 2017.

NIETO, Gema; ROS, Gaspar; CASTILLO, Julián. Antioxidant and antimicrobial properties of rosemary (*Rosmarinus officinalis*, L.): A Review. **Medicines**, v. 5, n. 3, p. 98, 2018.

NOGUCHI, Hiromitsu et al. Non-dermatophyte Mould Onychomycosis in Japan. **Medical Mycology Journal**, v. 61, n. 2, p. 23-31, 2020.

ONIGA, Iliora et al. *Origanum vulgare* ssp. *vulgare*: Chemical composition and biological studies. **Molecules**, v. 23, n. 8, p. 2077, 2018.

PARK, Mi-Jin et al. Antifungal activities of the essential oils in *Syzygium aromaticum* (L.) Merr. Et Perry and *Leptospermum petersonii* Bailey and their constituents against various dermatophytes. **The Journal of Microbiology**, v. 45, n. 5, p. 460-465, 2007.

PERUSINHA, C. G.; ROSADO, C.; LENCASTRE, A. Novos Avanços no Tratamento da Onicomicose. **Journal of the Portuguese Society of Dermatology and Venereology**, v. 77, n. 3, p. 239-243, 2019.

PEZZANI, Raffaele; VITALINI, Sara; IRITI, Marcello. Bioactivities of *Origanum vulgare* L.: an update. **Phytochemistry reviews**, v. 16, n. 6, p. 1253-1268, 2017.

PINTO, Eugenia et al. Antifungal activity of the essential oil of *Thymus pulegioides* on *Candida*, *Aspergillus* and dermatophyte species. **Journal of medical microbiology**, v. 55, n. 10, p. 1367-1373, 2006.

PIRACCINI, Bianca Maria; ALESSANDRINI, Aurora. Onychomycosis: a review. **Journal of Fungi**, v. 1, n. 1, p. 30-43, 2015.

POLA, Cícero C. et al. Cellulose acetate active films incorporated with oregano (*Origanum vulgare*) essential oil and organophilic montmorillonite clay control the growth of phytopathogenic fungi. **Food Packaging and Shelf Life**, v. 9, p. 69-78, 2016.

PRABHU, Sukumaran; POULOSE, Eldho K. Silver nanoparticles: mechanism of antimicrobial action, synthesis, medical applications, and toxicity effects. **International nano letters**, v. 2, n. 1, p. 32, 2012.

RAI, Mahendra et al. Synergistic antimicrobial potential of essential oils in combination with nanoparticles: Emerging trends and future perspectives. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 519, n. 1-2, p. 67-78, 2017.

RASOOLI, Iraj; REZAEI, Mohammad Bagher; ALLAMEH, Abdolamir. Growth inhibition and morphological alterations of *Aspergillus niger* by essential oils from *Thymus eriocalyx* and *Thymus x-porlock*. **Food Control**, v. 17, n. 5, p. 359-364, 2006.

RATTI, Matthew et al. Production of Metal Nanoparticles by Pulsed Laser-ablation in Liquids: A Tool for Studying the Antibacterial Properties of Nanoparticles. **JoVE (Journal of Visualized Experiments)**, n. 124, p. e55416, 2017.

ROSEN, Theodore; STEIN GOLD, Linda F. Antifungal drugs for onychomycosis: efficacy, safety, and mechanisms of action. **Semin Cutan Med Surg**, v. 35, n. Suppl 3, p. S51-S55, 2016.

SAAD, Nizar Y.; MULLER, Christian D.; LOBSTEIN, Annelise. Major bioactivities and mechanism of action of essential oils and their components. **Flavour and Fragrance Journal**, v. 28, n. 5, p. 269-279, 2013.

SAMBERG, Meghan E.; OLDENBURG, Steven J.; MONTEIRO-RIVIERE, Nancy A. Evaluation of silver nanoparticle toxicity in skin in vivo and keratinocytes in vitro. **Environmental health perspectives**, v. 118, n. 3, p. 407-413, 2010.

SATYAL, Prabodh et al. Chemotypic characterization and biological activity of *Rosmarinus officinalis*. **Foods**, v. 6, n. 3, p. 20, 2017.

SATPATHI, Parthasarathi et al. Onychomycosis in Eastern India-study in a peripheral tertiary care centre. **Journal of Pakistan Association of Dermatology**, v. 23, n. 1, p. 14-19, 2016.

SEGAL, Rina et al. Onychomycosis in Israel: epidemiological aspects. **Mycoses**, v. 58, n. 3, p. 133-139, 2015.

SHAH, Viral H.; JOBANPUTRA, Ameer. Enhanced ungual permeation of terbinafine HCl derived through liposome-loaded nail lacquer formulation optimized by QbD approach. **AAPS PharmSciTech**, New Orleans, v.19, n.1, p. 213-224, 2018.

SHARMA, Neelam et al. Nanotechnology: a modern contraption in cosmetics and dermatology. **Applied Clinical Research, Clinical Trials and Regulatory Affairs**, v. 5, n. 3, p. 147-158, 2018.

SILVA, Ana Paula da. **Novas estratégias para o diagnóstico de onicomicose e tratamento por terapia fotodinâmica**. 195 p. Tese (Doutorado – Programa de Pós-Graduação em Física Biomolecular) – Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, 2017.

SONTHALIA, Sidharth; AGRAWAL, Mahima; SEHGAL, V. N. Topical ciclopirox olamine 1%: Revisiting a unique antifungal. **Indian Dermatology Online Journal**, v. 10, n. 4, p. 481, 2019.

SOUZA, Nadabia Almeida Borges de et al. **Possíveis mecanismos de atividade antifúngica de óleos essenciais contra fungos patogênicos**. 2010. Tese (Doutorado em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos). Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2010.

SWAMY, Mallappa Kumara; AKHTAR, Mohd Sayeed; SINNIHAH, Uma Rani. Antimicrobial properties of plant essential oils against human pathogens and their mode of action: an updated review. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2016, 2016.

TOSTI, Antonella.; VLAHOVIC, Tracey C.; ARENAS, Roberto. **Onychomycosis: an illustrated guide to diagnosis and treatment**. Suíça: Springer, 2017.

TRAN, Q.H; NGUYEN, V. Q; LE, A.T. Silver nanoparticles: synthesis, properties, toxicology, applications and perspectives. **Advances in Natural Sciences: Nanoscience and Nanotechnology**, v.4, p. 1-20, 2018.

TULLIO, V. et al. Antifungal activity of essential oils against filamentous fungi determined by broth microdilution and vapour contact methods. **Journal of Applied Microbiology**, v.102, n. 6, p. 1544-1550, 2007.

VEIGA, F. F. et al. Fusarium oxysporum is an onychomycosis etiopathogenic agent. **Future microbiology**, v. 13, n. 16, p. 1745-1756, 2018.

VIEIRA, Gisely Spósito. **Análise sensorial: terminologia, desenvolvimento de padrões e treinamento de painelistas para avaliação de produtos cosméticos**. 2015. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo, São Paulo, 2015.

WELSH, Oliverio; VERA-CABRERA, Lucio; WELSH, Esperanza. Onychomycosis. **Clinics in dermatology**, v. 28, n. 2, p. 151-159, 2010.

WIJESUNDARA, Niluni M.; RUPASINGHE, HP Vasantha. Essential oils from *Origanum vulgare* and *Salvia officinalis* exhibit antibacterial and anti-biofilm activities against *Streptococcus pyogenes*. **Microbial pathogenesis**, v. 117, p. 118-127, 2018.

ZANE, Lee T. et al. Antifungal agents for onychomycosis: new treatment strategies to improve safety. **Dermatology online journal**, v. 22, n. 3, 2016.

ZUZARTE, M. et al. Antidermatophytic activity of essential oils. **Science against microbial pathogens: communicating current research and technological advances**, v. 1, p. 1167-1178, 2011.

ANEXOS

ANEXO A

Laudo técnico do óleo de orégano



LAUDO TÉCNICO

Óleo Essencial de Orégano

(*Origanum vulgare*)

CAS Number: 84012-24-8

INCI: Origanum vulgare Leaf Oil

Itens Controlados	Especificações
Aparência	Líquido límpido
Cor	Amarelo claro esverdeado a marrom escuro
Impurezas	Isento
Odor	Característico, especiaria
Densidade (20°C)	0,935 – 0,960
Índice de Refração (20°C)	1,500 – 1,520
Rotação Ótica	[-5° ; +2°]
Principais componentes (valores aproximados)	Carvacrol= 72% Timol= 2% Gama-terpineno= 4,5% Para-cimeno= 4% Linalol= 4%
Obtenção	Destilação a vapor das folhas.
Origem	Moldávia
Obs.: não contem OGM nem foi utilizado para teste em animais.	

Recomendações Especiais	
Manuseio	Uso de luvas, óculos de segurança ampla visão recomendável. Não ingerir. Evitar contato com a pele, olhos e mucosa. Se isso ocorrer, lavar imediatamente com água límpida em abundância. Em caso de derramamento, absorver o material derramado com material absorvente (areia, terra).
Riscos	Pode provocar irritação ou alergia na pele.
Incêndio	Caso haja fogo, utilizar extintor de pó químico seco e água em forma de neblina, não utilizando jatos de água para não espalhar o produto. Usar equipamento de proteção individual.
Explosividade	Nenhum perigo em condições normais.
Uso	Este produto destina-se ao uso profissional / industrial e como é elaborado a partir de substâncias naturais pode apresentar pequenas variações de cor e cromatografia sem causar qualquer problema na performance do produto.
Armazenamento	Armazenar em local seco, longe de umidade e do calor, protegido da luz, em recipiente original bem vedado. Não reutilizar a embalagem vazia.
Transporte	Número de risco:60 / Número da ONU:2810 / Classe ou Subclasse de risco: 6.1 / Descrição da classe ou subclasse: Substâncias tóxicas / Grupo de Embalagem: III

As informações contidas nesta publicação representam o melhor de nosso conhecimento. Entretanto, nada aqui mencionado deve ser entendido como garantia de uso. Os consumidores devem efetuar seus próprios ensaios para determinar a viabilidade da aplicação.

Engenheira Química Responsável: Alice Lasthaus CRQ: IV 04330754

ANEXO B

Laudo técnico do óleo de alecrim



LAUDO TÉCNICO

Óleo Essencial de Alecrim

(*Rosmarinus officinalis*)

CAS Number: 8000-25-7

INCI: Rosmarinus officinalis Leaf Oil

Itens Controlados	Especificações
Aparência	Líquido Límpido
Cor	Incolor a Amarelo Palha
Impurezas	Isento
Odor	Característico
Densidade (20°C)	0,900 – 0,930
Índice de Refração (20°C)	1,460 – 1,475
Rotação Ótica	[-2° ; +6°]
Principais componentes (valores aproximados)	1,8 cineol = 40% Cânfora = 15% Alfa pineno = 13% Beta pineno = 7% Limoneno = 3%
Obtenção	Destilação a vapor das folhas.
Origem	Marrocos ou Tunísia
Obs.: não contem OGM nem foi utilizado para teste em animais.	

Recomendações Especiais	
Manuseio	Uso de luvas, óculos de segurança ampla visão recomendável. Não ingerir. Evitar contato com a pele, olhos e mucosa. Se isso ocorrer, lavar imediatamente com água limpa em abundância. Em caso de derramamento, absorver o material derramado com material absorvente (areia, terra).
Riscos	Produto inflamável a temperatura acima de 47°C. Pode provocar irritação ou alergia na pele.
Incêndio	Caso haja fogo, utilizar extintor de pó químico seco e água em forma de neblina, não utilizando jatos de água para não espalhar o produto. Usar equipamento de proteção individual.
Explosividade	Nenhum perigo em condições normais.
Uso	Este produto destina-se ao uso profissional / industrial e como é elaborado a partir de substâncias naturais pode apresentar pequenas variações de cor e cromatografia sem causar qualquer problema na performance do produto.
Armazenamento	Armazenar em local seco, longe de umidade e do calor, protegido da luz, em recipiente original bem vedado. Não reutilizar a embalagem vazia.
Transporte	Número de risco:30 / Número da ONU:1169 / Classe ou Subclasse de risco: 3 / Descrição da classe ou subclasse: Líquidos Inflamáveis / Grupo de Embalagem: III

As informações contidas nesta publicação representam o melhor de nosso conhecimento. Entretanto, nada aqui mencionado deve ser entendido como garantia de uso. Os consumidores devem efetuar seus próprios ensaios para determinar a viabilidade da aplicação.

Engenheira Química Responsável: Alice Lasthaus CRQ: IV 04330754