

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
FACULDADE DE FARMÁCIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

**FORMULAÇÃO NANOTECNOLÓGICA PARA O MANEJO TÓPICO DE  
ONICOMICOSSES: pedido de patente, desenvolvimento e validação de método  
bioanalítico e estudos *in vitro* de permeação e atividade antifúngica em modelo  
ungueal**

ALEXANDRE ROLIM MINETO

Porto Alegre, 2023



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
FACULDADE DE FARMÁCIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

**FORMULAÇÃO NANOTECNOLÓGICA PARA O MANEJO TÓPICO DE  
ONICOMICOSSES: pedido de patente, desenvolvimento e validação de método  
bioanalítico e estudos *in vitro* de permeação e atividade antifúngica em modelo  
ungueal**

Dissertação apresentada por Alexandre  
Rolim Mineto para obtenção do GRAU DE  
MESTRE em Ciências Farmacêuticas

Orientadora: Profa. Dra. Letícia Scherer Koester

Porto Alegre, 2023

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas em nível de Mestrado Acadêmico da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul e aprovada com voto de louvor em 31 de outubro de 2023 pela Banca Examinadora constituída por:

Prof. Dr. Helder Ferreira Teixeira  
Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Profa. Dra. Kariana Paese  
Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Pra. Dra. Stephania Fleury Taveira  
Universidade Federal de Goiás

### CIP - Catalogação na Publicação

Mineto, Alexandre Rolim  
FORMULAÇÃO NANOTECNOLÓGICA PARA O MANEJO TÓPICO DE ONICOMICOSSES: pedido de patente, desenvolvimento e validação de método bioanalítico e estudos in vitro de permeação e atividade antifúngica em modelo ungueal / Alexandre Rolim Mineto. -- 2023.

187 f.

Orientadora: Letícia Scherer Koester.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Farmácia, Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Porto Alegre, BR-RS, 2023.

1. Onicomicoses. 2. Patente. 3. Permeação. 4. Atividade antifúngica. 5. Modelo ungueal. I. Koester, Letícia Scherer, orient. II. Título.

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Desenvolvimento Galênico (606), na Central Analítica (604), no Centro de Desenvolvimento Tecnológico Farmacêutico (CDTF) da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul e no Laboratório de Pesquisa em Micologia Aplicada do Anexo I da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Todos os experimentos foram realizados com financiamento do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS). O autor recebeu bolsa de estudos da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).



## **AGRADECIMENTOS**

À Universidade Federal do Rio Grande do Sul, à Faculdade de Farmácia e ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas pela estrutura e recursos.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de estudo.

À minha orientadora, Prof<sup>a</sup>. Dra. Letícia Scherer Koester, pela oportunidade e confiança.

Aos colegas do Laboratório de Desenvolvimento Galênico da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul e ao demais colaboradores deste trabalho pelo suporte técnico.

À Katia Cinara Tregnago Cunha pela revisão da redação do pedido de patente de invenção.

À minha família pelo apoio.





## RESUMO

Onicomicoses são infecções fúngicas ungueais causadas principalmente por *Trichophyton rubrum*. Constituem uma doença de difícil tratamento e requerem novas alternativas terapêuticas, especialmente tópicas. A *Aniba canelilla* (Kunth) Mez é uma árvore aromática oriunda da região amazônica. Seu óleo essencial possui propriedades antifúngicas e apresenta o 1-nitro-2-feniletano e o metileugenol como componentes majoritários. Nesse sentido, visando propor uma alternativa para o manejo tópico de onicomicoses, nosso grupo de pesquisa desenvolveu previamente um carreador lipídico nanoestruturado contendo o óleo essencial de *Aniba canelilla* (CLN<sub>OEAC</sub>) e um esmalte aquoso contendo essa mesma nanoestrutura (E-CLN<sub>OEAC</sub>). Com vistas a dar continuidade à linha de pesquisa, os objetivos deste trabalho foram: realizar o pedido de patente de invenção para as formulações nanotecnológicas; obter uma metodologia bioanalítica confiável para quantificação simultânea de 1-nitro-2-feniletano e metileugenol; e executar estudos *in vitro* de permeação e de atividade antifúngica, ambos em modelo ungueal, para as formulações nanotecnológicas. Um pedido de patente de invenção foi redigido e depositado no Instituto Nacional da Propriedade Industrial sob o número de processo BR1020220247790. Um método analítico por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência com tempos de retenção de 5,65 e 7,49 minutos foi desenvolvido por Delineamento Experimental e validado de acordo com os parâmetros recomendados pelos Guias ICH M10 e ICH Q2(R1). O CLN<sub>OEAC</sub> foi produzido por homogeneização à alta pressão e o E-CLN<sub>OEAC</sub> por liofilização seguido de redispersão em base de esmalte aquosa. Ambas as formulações apresentaram tamanho nanométrico, monodispersão, potencial zeta adequado e alta eficiência de encapsulação. Nos estudos de permeação em modelo ungueal, o 1-nitro-2-feniletano do CLN<sub>OEAC</sub> e do E-CLN<sub>OEAC</sub> foi capaz de atingir o fluido acceptor na ordem de  $854,2 \pm 82,9 \mu\text{g}/\text{cm}^2$  e  $244,1 \pm 23,7 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ , respectivamente, em 72 horas. O CLN<sub>OEAC</sub> apresentou  $100,00 \pm 0,00\%$  de remoção de células fúngicas em modelo ungueal infectado com *Trichophyton rubrum*, enquanto o E-CLN<sub>OEAC</sub> apresentou  $86,77 \pm 1,56\%$ . Adicionalmente, o CLN<sub>OEAC</sub> não mostrou crescimento fúngico na análise da recidiva. Tais achados demonstram que as formulações nanotecnológicas constituem uma alternativa terapêutica potencial para o manejo tópico de onicomicoses.

**Palavras-chave:** onicomicoses; patente; permeação; atividade antifúngica; modelo ungueal.



## ABSTRACT

NANOTECHNOLOGICAL FORMULATION FOR THE TOPICAL MANAGEMENT OF ONYCHOMYCOSIS: patent application, development and validation of a bioanalytical method and *in vitro* permeation and antifungal activity studies in nail model

Onychomycoses are fungal nail infections caused mainly by *Trichophyton rubrum*. This disease is difficult to treat and require new therapeutic alternatives, especially topical ones. *Aniba canelilla* (Kunth) Mez is an aromatic tree from the Amazon region. Its essential oil has antifungal properties and shows 1-nitro-2-phenylethane and methyleugenol as major compounds. In this sense, aiming to propose an alternative for the topical management of onychomycosis, our research group previously developed a nanostructured lipid carrier containing *Aniba canelilla* essential oil (NLC<sub>ACEO</sub>) and an aqueous nail polish containing this same nanostructure (P-NLC<sub>ACEO</sub>). Therefore, the aims of this work were: perform an invention patent application for the nanotechnological formulations; obtain a reliable bioanalytical method for the simultaneous quantification of 1-nitro-2-phenylethane and methyleugenol; and perform *in vitro* permeation and antifungal activity studies, both in nail model, for the nanotechnological formulations. An invention patent application was written and deposited at Instituto Nacional da Propriedade Industrial (INPI) under the process number BR1020220247790. A High-Performance Liquid Chromatography analytical method with retention times of 5.65 and 7.49 minutes was developed by Design of Experiment and validated according to the parameters recommended by ICH M10 and ICH Q2(R2) Guidelines. The NLC<sub>ACEO</sub> was produced by high-pressure homogenization and the P-NLC<sub>ACEO</sub> by freeze-drying followed by redispersion in an aqueous nail polish. Both formulations presented nanometric size, monodispersity, appropriate zeta potential and high encapsulation efficiency. In nail model permeation studies, 1-nitro-2-phenylethane from NLC<sub>ACEO</sub> and P-NLC<sub>ACEO</sub> was able to reach the acceptor fluid in the order of  $854.2 \pm 82.9 \mu\text{g}/\text{cm}^2$  and  $244.1 \pm 23.7 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ , respectively, at 72 hours. NLC<sub>ACEO</sub> showed  $100.00 \pm 0.00\%$  of fungal cells removal in the *Trichophyton rubrum* infected nail model, while P-NLC<sub>ACEO</sub> showed  $86.77 \pm 1.56\%$ . In addition, NLC<sub>ACEO</sub> showed no fungal growth in the relapse analysis. These findings demonstrate that the nanotechnological formulations are potential therapeutic alternatives for the topical management of onychomycosis.

**Key words:** onychomycosis; patent; permeation; antifungal activity; nail model.



## LISTA DE FIGURAS

### **INTRODUÇÃO E FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA**

<b>Figura 1.</b> Representação esquemática do aparato ungueal.....	25
<b>Figura 2.</b> Representação esquemática das camadas da lâmina ungueal.....	26
<b>Figura 3.</b> Unhas afetadas por onicomicoses.....	29
<b>Figura 4.</b> Estrutura química do 1-nitro-2-feniletano (A) e do metileugenol (B).....	31
<b>Figura 5.</b> Esquema representativo de uma Célula de Difusão de Franz estática vertical encamisada.....	41

### **ARTIGO CIENTÍFICO - Development by Design of Experiment and validation of a HPLC-UV method for simultaneous quantification of 1-nitro-2-phenylethane and methyleugenol: Application to nail permeation/retention studies**

<b>Graphical abstract</b> .....	48
<b>Figure 1.</b> (A) Pareto chart plots of 2 <sup>3</sup> Full Factorial design for NP and ME tailing factor and NP and ME retention time. A: represents organic phase composition; B: represents organic phase ratio; AB: represents the interaction between organic phase composition and organic phase ratio. The bars beyond the dotted lines represent statistically significant input factors ( $p < 0.05$ ). (B) Main effects plots of 2 <sup>3</sup> Full Factorial design for NP and ME tailing factor and NP and ME retention time.....	67
<b>Figure 2.</b> Contour plots of Box-Behnken design for NP and ME tailing factor, NP and ME retention time and NP and ME peak area.....	73
<b>Figure 3.</b> Selectivity for analytical validation (RF) and bioanalytical validation (PHE). (A) RF blank sample; (B) RF spiked with NP at 0.6 µg/mL and ME at 0.2 µg/mL; (C) RF spiked with NP at 200.0 µg/mL and ME at 40.0 µg/mL; (D) PHE blank sample; (E) PHE spiked with NP at 0.6 µg/mL and ME at 0.2 µg/mL; (F) PHE spiked with NP at 200.0 µg/mL and ME at 40.0 µg/mL; (1) NP peak; (2) ME peak.....	77
<b>Figure 4.</b> (A) Amount of NP and (B) ME retained in porcine hoof membrane (µg/cm <sup>2</sup> ) over 24, 48 and 72 h. Each value is the mean ± SD of six determinations (n = 6). No statistical difference was found between the times (Repeated Measures ANOVA, $p > 0.05$ ).....	83

**Figure 5.** Cumulative amount of NP permeated from porcine hoof membrane to receptor fluid ( $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ ) over 72 h. Each value is the mean  $\pm$  SD of six determinations ( $n = 6$ ). \*Indicates statistical difference between the times (Repeated Measures ANOVA followed by Bonferroni post hoc test,  $p < 0.05$ ). Amount permeated of ME was below the method Quantification Limit at all collection points..... 83

**Figure S1.** (A) Porcine hoof membranes and (B) porcine hoof membranes after 12 h of hydration. In image B, tweezers are holding a hydrated porcine hoof membrane for demonstration..... 90

**Figure S2.** Steps for placement of hydrated porcine hoof membrane between donor and receptor chambers of Franz diffusion cell..... 90

**Figure S3.** Analytical validation scatter plots (RF) of concentration *versus* peak area for (A) NP and (B) ME. Bioanalytical validation Scatter Plots (PHE) of concentration *versus* peak area for (C) NP and (D) ME..... 91

***ARTIGO CIENTÍFICO - Aniba canelilla (Kunth) Mez essential oil entrapped in nanostructured lipid carrier and aqueous nail polish containing this nanostructure for the management of onychomycosis: unguial/transungual delivery and antifungal activity by a novel infected nail model***

**Figure 1.** Amount of (A) 1-nitro-2-phenylethane (NP) and (B) methyleugenol (ME) retained in porcine hoof membrane ( $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ ) over 24, 48 and 72 h. Each value is the mean  $\pm$  standard deviation of six determinations ( $n = 6$ ). \*Indicates statistical difference between groups at each time (ANOVA followed by Bonferroni *post hoc* test,  $p < 0.05$ ). Crude<sub>ACEO</sub>: crude *Aniba canelilla* essential oil; NLC<sub>ACEO</sub>: *Aniba canelilla* essential oil entrapped in nanostructured lipid carrier; P-NLC<sub>ACEO</sub>: Aqueous nail polish containing *Aniba canelilla* essential oil entrapped in nanostructured lipid carrier..... 109

**Figure 2.** Cumulative amount of 1-nitro-2-phenylethane (NP) permeated from porcine hoof membrane to receptor fluid ( $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ ) over 72 h. Each value is the mean  $\pm$  standard deviation of six determinations ( $n = 6$ ). \*Indicates statistical difference between groups at each collection time (ANOVA followed by Bonferroni *post hoc* test,  $p < 0.05$ ). Amount permeated of methyleugenol (ME) was below the method Quantification Limit at all collection points. Crude<sub>ACEO</sub>: crude *Aniba canelilla* essential oil; NLC<sub>ACEO</sub>: *Aniba canelilla* essential oil entrapped in nanostructured lipid carrier; P-NLC<sub>ACEO</sub>: Aqueous nail polish containing *Aniba canelilla* essential oil entrapped in nanostructured lipid carrier..... 110

**Figure 3.** Analysis of relapse after the treatment period in *Trichophyton rubrum* infected nail model. (A) Negative control (uninfected and untreated); (B) positive control (infected and untreated); (C) *Aniba canelilla* essential oil entrapped in nanostructured lipid carrier (NLC<sub>ACEO</sub>); (D) Aqueous nail polish containing *Aniba canelilla* essential oil entrapped in nanostructured lipid carrier (P-NLC<sub>ACEO</sub>); (E) *Aniba canelilla* essential diluted in mineral oil (OM<sub>ACEO</sub>); (F) Blank nanostructured lipid carrier (NLC<sub>B</sub>); (G) Aqueous nail polish Vitabase<sup>®</sup> (P); (H) Aqueous nail polish Vitabase<sup>®</sup> containing blank nanostructured lipid carrier (P-NLC<sub>B</sub>)..... 116

**Figure S1.** Selectivity for content method validation. (A) Blank formulation (P-NLC<sub>B</sub>); (B) Blank formulation (P-NLC<sub>B</sub>) spiked with NP at 20.0 µg/mL and ME at 2.0 µg/mL; (C) Blank formulation (P-NLC<sub>B</sub>) spiked with NP at 110.0 µg/mL and ME at 20.0 µg/mL; (1) NP peak; (2) ME peak; NP: 1-nitro-2-phenylethane; ME: methyleugenol..... 123

**Figure S2.** Scatter plots of concentration versus peak area for (A) NP and (B) ME for content method validation; NP: 1-nitro-2-phenylethane; ME: methyleugenol..... 124





## LISTA DE TABELAS

### ***ARTIGO CIENTÍFICO - Development by Design of Experiment and validation of a HPLC-UV method for simultaneous quantification of 1-nitro-2-phenylethane and methyleugenol: Application to nail permeation/retention studies***

<b>Table 1.</b> Fitted models by stepwise regression for 2 <sup>3</sup> Full Factorial design.....	64
<b>Table 2.</b> Fitted models by stepwise regression for Box-Behnken design.....	68
<b>Table 3.</b> Output responses predicted values and its prediction intervals for the optimized input factors.....	71
<b>Table 4.</b> Parameters of HPLC-UV method developed for NP and ME quantification.....	72
<b>Table 5.</b> Analytical validation results (RF) for Repeatability, Intermediate Precision and Accuracy for NP and ME.....	76
<b>Table 6.</b> Bioanalytical validation results (PHE) for Within-run Accuracy and Precision and for Between-run Accuracy and Precision.....	79
<b>Table S1.</b> Randomized experimental matrix for 2 <sup>3</sup> Full Factorial design.....	89
<b>Table S2.</b> Randomized experimental matrix for Box-Behnken design.....	89

### ***ARTIGO CIENTÍFICO - Aniba canelilla (Kunth) Mez essential oil entrapped in nanostructured lipid carrier and aqueous nail polish containing this nanostructure for the management of onychomycosis: unguial/transungual delivery and antifungal activity by a novel infected nail model***

<b>Table 1.</b> Particle size distribution (PSD), polydispersity index (PDI), zeta potential, content and entrapment efficiency (EE) for NLC <sub>ACEO</sub> and P-NLC <sub>ACEO</sub> formulations.....	106
<b>Table 2.</b> Fungal cell removal percentage (%) in <i>Trichophyton rubrum</i> infected nail model.....	113
<b>Table S1.</b> Accuracy, Repeatability and Intermediate Precision results for content method validation.....	124



## SUMÁRIO

<b>INTRODUÇÃO E FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA .....</b>	<b>21</b>
<b>1. INTRODUÇÃO .....</b>	<b>21</b>
1.1 OBJETIVOS.....	23
1.1.1 Objetivo Geral.....	23
1.1.2 Objetivos específicos.....	23
<b>2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA .....</b>	<b>25</b>
2.1 FISIOANATOMIA DA UNHA HUMANA .....	25
2.2 ONICOMICOSSES.....	28
2.3 ÓLEO ESSENCIAL DE <i>Aniba canelilla</i> (Kunth) Mez .....	30
2.4 CARREADORES LIPÍDICOS NANOESTRUTURADOS .....	32
2.5 PROPRIEDADE INDUSTRIAL NO BRASIL.....	34
2.6 DESENVOLVIMENTO DE MÉTODOS ANALÍTICOS POR DELINEAMENTO EXPERIMENTAL .....	35
2.7 VALIDAÇÃO DE MÉTODOS ANALÍTICOS E BIOANALÍTICOS .....	38
2.8 ESTUDOS DE PERMEAÇÃO <i>IN VITRO</i> EM MODELO UNGUEAL .....	39
2.9 ESTUDOS DE ATIVIDADE ANTIFÚNGICA EM MODELO UNGUEAL ....	42
<b>ARTIGO CIENTÍFICO .....</b>	<b>45</b>
<b>3. ARTIGO CIENTÍFICO - Development by Design of Experiment and validation of a HPLC-UV method for simultaneous quantification of 1-nitro-2- phenylethane and methyleugenol: Application to nail permeation/retention studies .....</b>	<b>47</b>
<b>ARTIGO CIENTÍFICO .....</b>	<b>93</b>
<b>4. ARTIGO CIENTÍFICO - <i>Aniba canelilla</i> (Kunth) Mez essential oil entrapped in nanostructured lipid carrier and aqueous nail polish containing this nanostructure for the management of onychomycosis: unguinal/transungual delivery and antifungal activity by a novel infected nail model.....</b>	<b>95</b>
<b>DISCUSSÃO E CONCLUSÃO.....</b>	<b>127</b>
<b>5. DISCUSSÃO .....</b>	<b>129</b>
<b>6. CONCLUSÃO .....</b>	<b>135</b>
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>137</b>
<b>ANEXO – Pedido de patente de invenção depositado no Instituto Nacional da Propriedade Industrial (INPI).....</b>	<b>145</b>



## INTRODUÇÃO E FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

---



## 1. INTRODUÇÃO

Onicomicoses são infecções fúngicas localizadas nas unhas dos pés ou das mãos, as quais impactam negativamente na qualidade de vida dos indivíduos acometidos (LIPNER; SCHER, 2019a). São consideradas a principal doença que afeta as unhas e ocorrem principalmente em idosos e imunocomprometidos. Clinicamente, causam o amarelamento, espessamento e descolamento da lâmina ungueal. Fungos dermatófitos, àqueles pertencentes às espécies *Trichophyton* spp., *Epidermophyton* spp. e *Microsporum* spp., são os principais agentes etiológicos da doença (LEUNG et al., 2019).

A terapia medicamentosa oral e/ou tópica consiste no recurso mais comumente adotado para o manejo de onicomicoses. Porém, está atrelada a um longo tempo requerido de tratamento, a altas chances de recidiva e a baixa adesão pelo paciente (BAROT et al., 2014). Além disso, o uso de medicamentos administrados oralmente pode causar efeitos adversos e interações medicamentosas, o que é crítico principalmente para pacientes que fazem o uso contínuo de outros medicamentos (LIPNER; SCHER, 2019b).

Nesse sentido, a terapia medicamentosa tópica contorna as desvantagens da sistêmica. Entretanto, considerando a alta quantidade de queratina na lâmina ungueal, a qual estabelece redes de interações intermoleculares fortes e estáveis, principalmente através de ligações de dissulfeto e de hidrogênio, a unha exerce um efeito barreira à entrada de substâncias exógenas (BASWAN et al., 2017). Sendo assim, o tratamento tópico geralmente perdura por mais tempo que o sistêmico e apresenta eficácia limitada, o que está associado à dificuldade dos compostos ativos em permear através unha (DHAMOON; POPLI; GUPTA, 2019).

Tendo em vista esse cenário, diversos sistemas que visam aprimorar a permeação de compostos ativos através da unha estão sendo estudados e desenvolvidos, visando novas opções terapêuticas tópicas para o tratamento das onicomicoses (DHAMOON; POPLI; GUPTA, 2019). Dentre esses sistemas, há um destaque para as formulações que empregam a nanotecnologia, a qual é definida, para produtos de saúde, como o uso da matéria com pelo menos um componente na escala nanométrica, geralmente variando de 1 a 1000 nm (ARAUJO et al., 2021).

Formulações nanotecnológicas que vêm sendo desenvolvidas englobam: nanopartículas poliméricas, nanoemulsões, nanoemulgéis, lipossomas, nanopartículas lipídicas sólidas e carreadores lipídicos nanoestruturados (ARAUJO et al., 2021; FLORES et al., 2017; MAHTAB et al., 2016; ROCHA et al., 2017). Em geral, para esses sistemas são relatadas diversas vantagens, além do aprimoramento das propriedades de permeação, dentre as quais as principais são: aumento da estabilidade físico-química, proteção do composto ativo contra reações de degradação e controle da liberação (DHAMOON; POPLI; GUPTA, 2019).

Além disso, o uso de extratos vegetais e de óleos essenciais com propriedades antifúngicas vem sendo explorado para o tratamento tópico de infecções fúngicas. Esses produtos naturais compreendem uma alternativa para contornar os casos de resistência fúngica, os quais levam à inefetividade do tratamento e a recidivas com a administração dos fármacos antifúngicos convencionais (KHOSRAVI; SHOKRI; SAFFARIAN, 2020; TAMPUCCI et al., 2020). Diversos estudos demonstram o potencial antifúngico de extratos vegetais e de óleos essenciais veiculados em diferentes formas farmacêuticas, o que leva a crer que o emprego dessas substâncias é uma abordagem promissora no delineamento de novas formulações antifúngicas (DEYNO et al., 2019; TAMPUCCI et al., 2020).

*Aniba canelilla* (Kunth) Mez, popularmente conhecida como casca-preciosa, é uma árvore de porte médio presente na região amazônica, cujo óleo essencial pode ser obtido a partir da hidrodestilação de diferentes partes da planta, tal como cascas, galhos e folhas (SOUZA-JUNIOR et al., 2020). O óleo essencial de casca-preciosa possui o 1-nitro-2-feniletano e o metileugenol como constituintes majoritários e apresenta diversas atividades terapêuticas descritas em literatura, como antioxidante, anti-inflamatória, anticolinesterásica, hipotensora e antifúngica (DA SILVA et al., 2007; DE SIQUEIRA et al., 2010; KREUTZ et al., 2021; SILVA et al., 2014; SOUZA et al., 2020).

Considerando o exposto, Kreutz e colaboradores (2021), integrantes do nosso grupo de pesquisa, desenvolveram um carreador lipídico nanoestruturado contendo o óleo essencial de *Aniba canelilla* (CLN<sub>OEAC</sub>) e um esmalte aquoso contendo essa mesma nanoestrutura (E-CLN<sub>OEAC</sub>), visando propor novas alternativas para o manejo tópico de onicomicoses. O CLN<sub>OEAC</sub> é produzido por homogeneização à alta pressão, enquanto o E-CLN<sub>OEAC</sub> é obtido por liofilização seguido de redispersão em base de esmalte aquosa (KREUTZ, 2021). Tendo em vista o potencial inovador dessas



formulações, um pedido de patente de invenção era requerido visando a proteção da propriedade industrial. Ademais, estudos de permeação/retenção e de atividade antifúngica em modelo ungueal se faziam necessários para assegurar a eficácia das formulações (CLN<sub>OEAC</sub> e E-CLN<sub>OEAC</sub>), o que fez parte do escopo desta dissertação de mestrado.

## 1.1 OBJETIVOS

### 1.1.1 Objetivo Geral

Realizar o pedido de patente de invenção e avaliar a eficácia *in vitro* em modelo ungueal do carreador lipídico nanoestruturado contendo o óleo essencial de *Aniba canelilla* (CLN<sub>OEAC</sub>) e do esmalte aquoso contendo essa nanoestrutura (E-CLN<sub>OEAC</sub>).

### 1.1.2 Objetivos específicos

- a) Depositar um pedido de patente de invenção para o CLN<sub>OEAC</sub> e o E-CLN<sub>OEAC</sub> no Instituto Nacional da Propriedade Industrial (INPI);
- b) Obter um método analítico por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência para determinação simultânea de 1-nitro-2-feniletano e metileugenol em amostras de estudos *in vitro* de permeação/retenção em modelo ungueal;
- c) Obter uma metodologia para a condução de estudos *in vitro* de permeação/retenção em modelo ungueal;
- d) Quantificar com confiabilidade o 1-nitro-2-feniletano e o metileugenol no fluido aceptor e na matriz biológica de modelo ungueal;
- e) Avaliar o perfil de permeação/retenção *in vitro* em modelo ungueal do 1-nitro-2-feniletano e do metileugenol para o CLN<sub>OEAC</sub> e o E-CLN<sub>OEAC</sub>;
- f) Verificar a atividade antifúngica *in vitro* em modelo ungueal para CLN<sub>OEAC</sub> e o E-CLN<sub>OEAC</sub>.



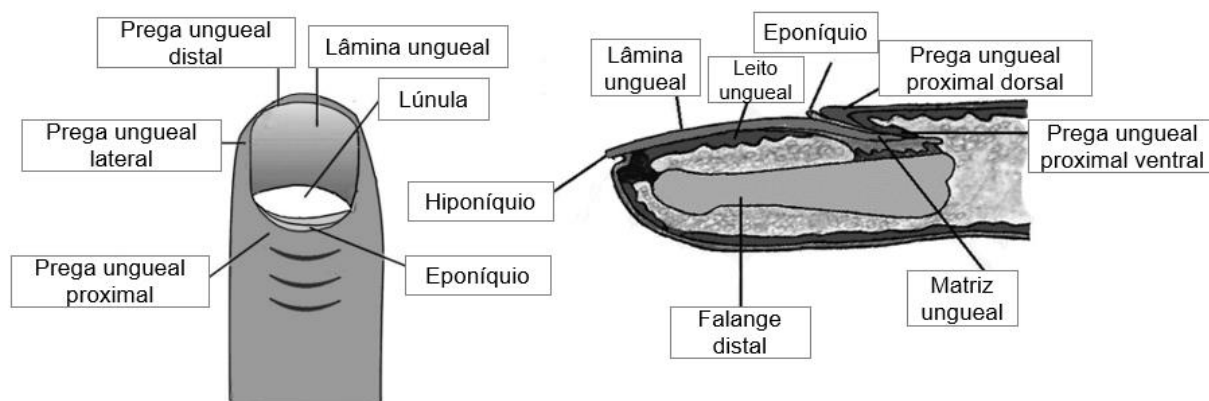
## 2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

### 2.1 FISIOANATOMIA DA UNHA HUMANA

A unha humana consiste em uma estrutura rígida e altamente queratinizada que compõe a extremidade da superfície superior dos dedos das mãos e dos pés, apresentado como principais funções a proteção das falanges distais e o aumento da destreza. Além disso, representa um atributo estético (BASWAN et al., 2017).

O desenvolvimento das unhas inicia no útero e seu crescimento ocorre continuamente durante toda a vida. A taxa média de crescimento da unha madura é de 0,1 mm ao dia e de 3,0 mm ao mês, sendo que as unhas das mãos crescem de duas a três vezes mais rápido do que a dos pés (BASWAN et al., 2017). Já a sua espessura média situa-se em torno de 0,6 mm (THATAI; SAPRA, 2014).

As principais partes que compõem o aparato ungueal são: as pregas ungueais, a lâmina ungueal, a matriz ungueal, a lúnula, o leito ungueal, o hiponíquio e o eponíquio (BAROT et al., 2014; WALTERS; ABDALGHAFOR; LANE, 2012). A Figura 1 abaixo apresenta uma representação esquemática dos componentes da unha humana.



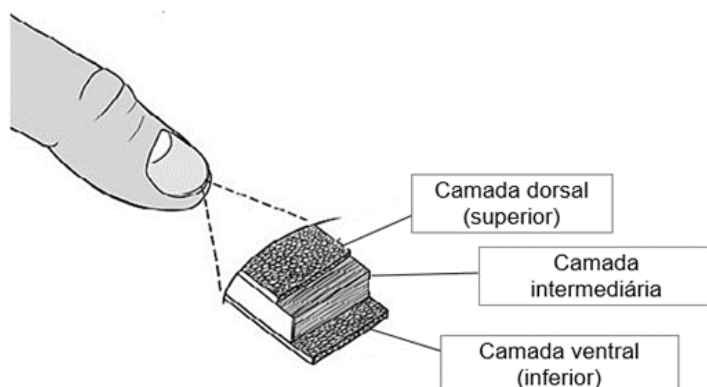
**Figura 1.** Representação esquemática do aparato ungueal.

Fonte: adaptado de BAROT *et al.*, 2014.

Anatomicamente, a lâmina ungueal consiste em uma estrutura plana, retangular e translúcida, que cobre completamente o leito ungueal, originando-se a partir da matriz ungueal; a matriz ungueal emerge da prega ungueal proximal e é composta por um epitélio escamoso estratificado que contém as células precursoras da lâmina ungueal; a lúnula compreende a porção visível da matriz ungueal, apresentando-se em formato de meia lua de coloração esbranquiçada; as pregas ungueais, subdivididas de acordo com a sua localização em proximal, lateral, distal,

dorsal e ventral, são uma extensão da epiderme e constituídas de tecido cornificado, envolvendo a lâmina ungueal em seus três lados, compondo a região em que a lâmina ungueal e a pele se encontram; o hiponíquio compreende a continuação da lâmina ungueal, não está aderido ao leito ungueal e possui coloração esbranquiçada; o eponíquio, forma uma fina camada de material queratinoso denominado de cutícula que contorna as pregas ungueais e fornece proteção contra a entrada de agentes químicos e biológicos; o leito ungueal é a superfície de epitélio macio, fino e não cornificado de cor rosada, na qual a lâmina ungueal se deposita (BAROT et al., 2014; BASWAN et al., 2017).

A lâmina ungueal, principal estrutura da unha, é composta por células queratinizadas achatadas e cresce distalmente a partir da matriz ungueal. Durante o processo de queratinização, suas células sofrem alterações morfológicas e estruturais, semelhante ao que ocorre com as células epidérmicas que formam o estrato córneo da pele (BASWAN et al., 2017). Dessa forma, perdem seu núcleo e suas organelas, sendo compostas principalmente por fibras de queratina. A lâmina ungueal, portanto, apresenta uma estrutura de epitélio cornificado, sendo dividida em três grandes camadas: dorsal, intermediária e ventral, conforme representado na Figura 2 (WALTERS; ABDALGHAFOR; LANE, 2012). Suas camadas estão firmemente aderidas umas às outras e, juntas, possuem em média 196 camadas de células. A proporção de espessura é de 3:5:2 para as camadas dorsal:intermediária:ventral (BASWAN et al., 2017; THATAI; SAPRA, 2017).



**Figura 2.** Representação esquemática das camadas da lâmina ungueal.

Fonte: adaptado de BASWAN *et al.*, 2017.

A lâmina ungueal é composta majoritariamente por alfa-queratina, uma proteína fibrosa que contém grande quantidade de enxofre em sua estrutura química e que se apresenta em conformação helicoidal (BASWAN et al., 2017). Os aminoácidos

constituintes de uma cadeia de queratina interagem quimicamente, condensando-se em conformação helicoidal, o que resulta na alfa-queratina; quando duas cadeias isoladas de alfa-queratina interagem, ocorre a formação de dímeros espiralados com ligações de dissulfeto reticuladas; esses dímeros de alfa-queratina podem se associar através de interações cauda-cabeça, formando uma estrutura linear e originando as protofibrilas; ainda, a interação entre oito unidades protofibrilas resulta na estrutura chamada de filamento intermediário ou microfibrila (BASWAN et al., 2017).

Portanto, a rigidez da lâmina ungueal é atribuída ao agrupamento das cadeias de alfa-queratina, o qual ocorre por ligações cruzadas de dissulfeto, ligações de hidrogênio e interações de Van der Waals. Todas essas interações, em conjunto, permitem a formação de uma matriz compactada e estável (THATAI; SAPRA, 2017; WALTERS; ABDALGHAFOR; LANE, 2012).

Os filamentos de alfa-queratina da camada intermediária encontram-se bem alinhados e orientados perpendicularmente ao eixo de crescimento da lâmina ungueal, enquanto os filamentos de alfa-queratina das camadas dorsal e ventral apresentam-se sobrepostos e distribuídos aleatoriamente, sem uma orientação preferencial (BASWAN et al., 2017), conforme pode-se observar na Figura 2 acima. As células da camada dorsal apresentam uma membrana plasmática espessada e são anucleadas, enquanto a camada intermediária possui restos nucleares. As células da camada ventral, por sua vez, emergem do leito ungueal (THATAI; SAPRA, 2017).

Além da constituição proteica, a lâmina ungueal é composta por 7 a 12% de água nas formas livre e ligada, sendo a última a mais predominante, e por 0,1 a 1% de lipídios, dos quais o principal é o colesterol. Ademais, uma quantidade variada de minerais, como sódio, potássio, cálcio, zinco e ferro também está presente (THATAI; SAPRA, 2017).

O leito ungueal corresponde a uma superfície de epitélio fino, não cornificado e desprovido de glândulas sebáceas, o qual se encontra abaixo da lâmina ungueal e se estende da matriz ungueal ao hiponíquio (BAROT et al., 2014). Apresenta coloração rosada devido ao enriquecido suprimento vascular que nos tecidos logo abaixo do leito ungueal (BASWAN et al., 2017). Essa estrutura da unha é considerada uma zona de transição, em que as células constituintes se queratinizam e, após, emergem para integrar a lâmina ungueal. Além disso, o leito ungueal possui terminações nervosas que são responsáveis pela sensibilidade ao toque e à pressão (BASWAN et al., 2017; WALTERS; ABDALGHAFOR; LANE, 2012).

## 2.2 ONICOMICOSSES

Onicomicoses são infecções de unha causadas por fungos dermatófitos, não-dermatófitos e leveduras, as quais apresentam como principais sintomas a descoloração e espessamento da lâmina ungueal (GUPTA et al., 2020). As onicomicoses correspondem a cerca de 50% das doenças que afetam as unhas, sendo consideradas a doença ungueal mais comum. Sua prevalência mundial é de, aproximadamente, 5,5% (LEUNG et al., 2019; LIPNER; SCHER, 2019a). Fatores de risco para essa doença incluem: idade avançada, traumas na unha, uso de sapatos oclusivos e apertados, hiperidrose, predisposição genética, imunodeficiências, diabetes melito, obesidade, psoríase, tabagismo, dentre outros (LIPNER; SCHER, 2019a).

Aproximadamente 90% das onicomicoses de pés e 75% das onicomicoses de mãos são causadas por fungos dermatófitos, destacando-se o agente *Trichophyton rubrum* (LEUNG et al., 2019; LIPNER; SCHER, 2019a). Outros gêneros e espécies de dermatófitos causadores incluem: *Trichophyton mentagrophytes*, *Epidermophyton floccosum* e *Microsporum* spp. (LEUNG et al., 2019). Fungos não dermatófitos correspondem a cerca de apenas 10% dos casos de onicomicoses e incluem espécies de *Aspergillus*, *Scopulariopsis* e *Fusarium*. Onicomicoses causadas por leveduras são raras, porém, quando ocorrem, o principal agente causador é a *Candida albicans* (LEUNG et al., 2019; LIPNER; SCHER, 2019a).

Os fungos causadores de onicomicoses produzem enzimas queratolíticas, as quais são responsáveis por degradar a queratina da lâmina ungueal, facilitando a invasão fúngica (LIPNER; SCHER, 2019a). Clinicamente, as onicomicoses caracterizam-se pela aquisição de coloração esbranquiçada ou amarelada das unhas, hiperqueratose subungueal, descolamento da lâmina ungueal do leito ungueal (onicólise) e espessamento da lâmina ungueal (GUPTA et al., 2020), conforme demonstrado na Figura 3. Em geral, as unhas dos pés são afetadas de sete a dez vezes mais frequentemente do que as unhas das mãos. Portanto, essa doença gera implicações físicas e sociais, como dor local e constrangimentos devido à estética alterada das unhas, impactando negativamente a qualidade de vida do indivíduo (BAROT et al., 2014; LIPNER; SCHER, 2019a).



**Figura 3.** Unhas afetadas por onicomicoses.

Fonte: adaptado de LEUNG *et al.*, 2019.

As onicomicoses podem ser subdivididas em cinco categorias de acordo com o padrão de invasão do fungo e com as características clínicas, sendo que um paciente pode adquirir simultaneamente mais que um subgrupo. Os diferentes tipos de onicomicoses são: (1) Onicomicose Subungueal Lateral Distal; (2) Onicomicose Superficial Branca; (3) Onicomicose Subungueal Proximal; (4) Onicomicose Endonix; (5) Onicomicose Distrófica Total (LEUNG *et al.*, 2019).

O diagnóstico dessa doença é dado principalmente através da avaliação clínica e do exame físico do paciente. Entretanto, testes laboratoriais confirmatórios são recomendados, como a microscopia direta, a cultura fúngica e ensaios de histopatologia (GUPTA *et al.*, 2020; LIPNER; SCHER, 2019a).

O tratamento das onicomicoses pode ser realizado pelo uso de medicamentos antifúngicos orais e/ou tópicos, laser, terapia fotodinâmica ou avulsão cirúrgica da lâmina ungueal (GUPTA *et al.*, 2020; LIPNER; SCHER, 2019b). O objetivo do tratamento consiste em eliminar o agente infeccioso e restaurar o aspecto normal da unha conforme o seu crescimento (LIPNER; SCHER, 2019b).

A terapia medicamentosa é o recurso mais empregado devido à acessibilidade e maior conveniência para o paciente. Os medicamentos orais indicados incluem a terbinafina, na dose diária de 250 mg por 6 semanas para onicomicoses de mãos e 12 semanas para onicomicoses de pés; o itraconazol, na dose diária de 200 mg por 12 semanas para onicomicoses de pés e dois pulsos de tratamento de 200 mg duas vezes ao dia por 1 semana seguido de 3 semanas sem a administração para onicomicoses de mãos; e o fluconazol, na dose semanal de 150 mg por 12 a 18 meses para onicomicoses de pés e por 6 a 9 meses para onicomicoses de mãos (GUPTA *et*

al., 2020; LIPNER; SCHER, 2019b). Terapias medicamentosas tópicas compreendem o uso de ciclopirox a 8% e de amorolfina a 5% nas formas farmacêuticas de esmalte ou solução por 12 meses para onicomicoses de pés e por 6 meses para onicomicoses de mãos (GUPTA et al., 2020; LIPNER; SCHER, 2019b).

Os medicamentos orais disponíveis estão associados a efeitos adversos, interações medicamentosas e hepatotoxicidade (LIPNER; SCHER, 2019b). Por outro lado, apesar dos medicamentos tópicos evitarem tais consequências pela administração diretamente sobre a unha, requerem um maior tempo de tratamento e apresentam maiores chances de recidiva (GUPTA et al., 2020). Tais fatos resultam na baixa adesão à terapia medicamentosa pelos pacientes (LEUNG et al., 2019). Além disso, após o término da terapia medicamentosa oral e/ou tópica, recidivas ou reinfecções ocorrem em 20 a 25% dos casos (LIPNER; SCHER, 2019b).

A eficácia limitada da terapia tópica é correlacionada à dificuldade dos fármacos em permear através da lâmina ungueal, devido à sua composição altamente queratinizada que gera uma microestrutura rígida e compactada (DHAMOON; POPLI; GUPTA, 2019). Nesse sentido, as onicomicoses são consideradas de difícil tratamento e necessitam de novas opções terapêuticas, especialmente tópicas, que visem otimizar a permeação de compostos ativos através da unha (BAROT et al., 2014; DHAMOON; POPLI; GUPTA, 2019).

### 2.3 ÓLEO ESSENCIAL DE *Aniba canelilla* (Kunth) Mez

A *Aniba canelilla* (Kunth) Mez é uma árvore aromática de porte médio pertencente à família Lauraceae (DA TRINDADE et al., 2021). Popularmente, é conhecida como casca-preciosa, falsa canela, casca do Maranhão ou folha preciosa, apresentando um aroma semelhante ao da canela (SOUZA-JUNIOR et al., 2020). Essa espécie é nativa de países da América do Sul (Bolívia, Brasil, Colômbia, Equador, Peru e Venezuela), sendo encontrada principalmente na região amazônica (SOUZA-JUNIOR et al., 2020).

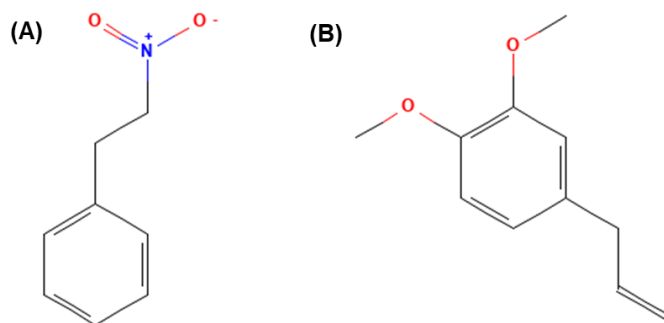
O óleo essencial de *Aniba canelilla* (OEAC) pode ser extraído a partir do tronco, galhos, folhas e cascas dessa árvore por destilação de arraste a vapor ou por hidrodestilação, fazendo-se o uso de um aparato do tipo Clevenger (TAVEIRA et al., 2003). Tipicamente, o rendimento da extração varia de 0,2 a 1,3% (SOUZA-JUNIOR et al., 2020; TAVEIRA et al., 2003). O OEAC apresenta como características organolépticas coloração marrom-amarelada e odor característico semelhante ao da



canela. Além disso, possui uma densidade maior que a da água (KREUTZ et al., 2018).

A produção de óleo essencial é influenciada por diversos fatores, tais como condições ambientais, especialmente umidade e incidência de luz, variações genéticas e fisiológicas da planta e sua localização geográfica (MANHÃES et al., 2012; SOUZA-JUNIOR et al., 2020). Estudos demonstram, em geral, um maior rendimento na extração do OEAC em épocas chuvosas, nos períodos iniciais de desenvolvimento dos órgãos da planta e em condições de maior incidência de luz (DA TRINDADE et al., 2021; SOUZA-JUNIOR et al., 2020).

O OEAC apresenta dois principais constituintes, o 1-nitro-2-feniletano, o qual é relatado como sendo o componente majoritário, e o metileugenol (TAVEIRA et al., 2003), cujas moléculas estão representadas na Figura 4. Outros componentes já identificados em menores quantidades no OEAC incluem o eugenol, o safrol, a anabasina, o alfa e o beta pineno, o beta felandreno, o beta cariofileno, o linalol, o alfa copaeno, o spatulenol e o benzaldeído (DA TRINDADE et al., 2021; LIMA et al., 2004; SOUZA et al., 2020).



**Figura 4.** Estrutura química do 1-nitro-2-feniletano **(A)** e do metileugenol **(B)**.

Fonte: adaptado de NATIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION, 2023.

O 1-nitro-2-feniletano é um nitroderivado raramente encontrado em plantas, sintetizado pela biotransformação da fenilalanina por enzimas da CYP (SOUZA-JUNIOR et al., 2020). Possui fórmula massa molecular de 151,16 g/mol e logP de 2,1 (NATIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION, 2023a). O metileugenol, denominado quimicamente de 1-aliil-3,4-dimetoxibenzeno, é formado pela reação de metilação do eugenol, composto fenólico que também pode estar presente no OEAC (SOUZA-JUNIOR et al., 2020). Apresenta massa molecular de 178,23 g/mol e logP de 2,5 (NATIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION, 2023b).

A composição do OEAC varia pelos mesmos fatores relatados anteriormente para o rendimento de sua extração, sendo influenciada principalmente pela sazonalidade e pela localização geográfica da planta. Além disso, também varia significativamente de acordo com a parte da planta utilizada para extração (SOUZA-JUNIOR et al., 2020; TAVEIRA et al., 2003).

Diversos estudos já foram realizados para avaliar as propriedades terapêuticas do OEAC. Atividades biológicas relatadas em literatura, investigadas por meio de modelos *in vivo* ou *in vitro*, para o OEAC ou para seu constituinte majoritário incluem: antifúngica, antitripanocida, antioxidante, anti-inflamatória, anti-quimiotática, anticolinesterásica, hipotensora e bradicárdica (DA SILVA et al., 2007; DE SIQUEIRA et al., 2010; GIONGO et al., 2017; KREUTZ et al., 2021, 2023; OGER et al., 1994; SILVA et al., 2014; SOUZA et al., 2020). Contudo, apesar das atividades terapêuticas demonstradas, o emprego do OEAC no desenvolvimento tecnológico de formulações ainda é restrito.

#### 2.4 CARREADORES LIPÍDICOS NANOESTRUTURADOS

Carreadores lipídicos nanoestruturados (CLN) são dispersões aquosas nas quais a fase dispersa, constituída por uma mistura de lipídios sólido e líquido à temperatura ambiente, possui tamanho compreendido na escala nanométrica, geralmente entre 10 a 500 nm (SHARMA; BALDI, 2018). A proporção entre lipídio sólido e líquido tipicamente varia de 70:30 a 99,9:0,1 (SHARMA; BALDI, 2018). Além disso, os CLN são formados pela presença de tensoativos na interface lipídio-água (MISHRA et al., 2018).

Os CLN são descritos como a segunda geração de nanopartículas lipídicas sólidas, sistemas em que a fase lipídica é composta somente por lipídio(s) sólido(s) à temperatura ambiente, o que resulta na cristalização do lipídio sólido e pode gerar a expulsão do composto ativo do núcleo lipídico (FANG; AL-SUWAYEH; FANG, 2013). Dessa maneira, os CLN podem contornar essa desvantagem pela adição de um lipídio líquido, o que evita a cristalização da fase dispersa (FANG; AL-SUWAYEH; FANG, 2013).

Os CLN podem ser empregados tanto para veiculação de compostos ativos de caráter hidrofóbico, os quais situam-se aprisionados no núcleo lipídico, quanto para veiculação de compostos ativos de caráter hidrofílico, os quais, nesse caso, encontram-se junto à camada de tensoativos, na interface lipídio-água (SHARMA;

BALDI, 2018). Diversas vantagens são atribuídas ao emprego de CLN na área farmacêutica, dentre as quais destacam-se: biocompatibilidade; controle da liberação do composto ativo; estabilidade físico-química; otimização das propriedades de permeação através da pele e anexos cutâneos; e aumento da biodisponibilidade sistêmica (FANG; AL-SUWAYEH; FANG, 2013; MISHRA et al., 2018; SHARMA; BALDI, 2018; TAPEINOS; BATTAGLINI; CIOFANI, 2017).

Ademais, os CLN fornecem proteção físico-química para compostos ativos lábeis, especialmente àqueles susceptíveis à degradação por fatores externos, como luz, calor e oxigênio, e à volatilização. Sendo assim, constituem uma alternativa para veiculação de produtos naturais, tais como os óleos essenciais, de modo a aumentar sua estabilidade (KATOPODI; DETSI, 2021).

Diferentes técnicas podem ser empregadas para produção de CLN, como, por exemplo: homogeneização à alta pressão; a homogeneização a alto cisalhamento; a ultrassonicação; a microemulsão; a emulsificação com evaporação de solvente; e a inversão de fases (MISHRA et al., 2018; SHARMA; BALDI, 2018; TAPEINOS; BATTAGLINI; CIOFANI, 2017). Dentre as técnicas mencionadas, destaca-se a homogeneização à alta pressão pois evita o uso de solventes orgânicos (MARTÍNEZ-MONTEAGUDO; YAN; BALASUBRAMANIAM, 2017; SCHULTZ et al., 2004).

O homogeneizador à alta pressão contém um pistão que opera sob alta energia, forçando a passagem da formulação por um espaço anular. Dessa forma, o equipamento realiza a subdivisão das gotículas da fase lipídica de uma emulsão previamente formada (denominada de pré-emulsão ou emulsão grosseira) em gotículas de tamanho nanométrico. Outras vantagens atribuídas a essa técnica compreendem a obtenção de partículas com tamanho reduzido e padronizado, ou seja, com baixo índice de polidispersão (PATEL et al., 2013; TAPEINOS; BATTAGLINI; CIOFANI, 2017).

Para caracterização físico-química de CLN, tipicamente são determinados o tamanho, o índice de polidispersão, o potencial zeta e a eficiência de encapsulamento, os quais são parâmetros capazes de prever a estabilidade e a qualidade do nanossistema (ROCHA et al., 2017; TAMJIDI et al., 2013). Em suma, um tamanho reduzido (na escala nanométrica) é desejável para as nanopartículas, visando otimizar a estabilidade físico-química do sistema e as propriedades de permeação; um baixo índice de polidispersão ( $< 0,3$ ) é requerido pois indica que as nanopartículas do sistema apresentam um tamanho aproximado, estando monodispersas; um potencial

zeta alto ( $> 30$  mV em módulo) é desejável pois contribui para a estabilidade do sistema pela repulsão eletrostática entre as nanopartículas, evitando sua agregação; uma alta eficiência de encapsulamento é requerida pois aponta a quantidade de composto ativo aprisionada na nanoestrutura (TAMJIDI et al., 2013).

## 2.5 PROPRIEDADE INDUSTRIAL NO BRASIL

No Brasil, a Lei 9.279 de 1996 regula os direitos e obrigações relativos à propriedade industrial. Está abrangido no escopo da propriedade industrial o conjunto de proteção de direitos sobre marcas, patentes, desenhos industriais, indicações geográficas, assim como a repressão às falsas indicações geográficas e a repressão à concorrência desleal (BRASIL, 1996).

No âmbito das patentes, essas são divididas em patentes de invenção e de modelo de utilidade. Uma patente de invenção, que pode abranger produtos e/ou processos, deve atender a três requisitos básicos: novidade, atividade inventiva e aplicação industrial. Novidade é aquilo que não está compreendido no estado da técnica, ou seja, que não foi publicado ou tornado acessível ao público até a data de depósito do pedido de patente. Um produto ou processo possui atividade inventiva quando sua concepção não é óbvia ou evidente para um técnico no assunto. Modelos de utilidade são considerados patenteáveis quando consistem em um objeto que apresente melhoria funcional envolvendo ato inventivo e possibilidade de aplicação industrial. Não são considerados patenteáveis, por exemplo: teorias científicas, obras artísticas, regras de jogo, métodos terapêuticos e de diagnóstico, seres vivos ou parte deles (BRASIL, 1996).

Uma patente concedida pelo Instituto Nacional da Propriedade Industrial (INPI) garante ao seu titular o direito de impedir terceiros, sem o seu consentimento, de produzir, usar, colocar à venda, vender ou importar o produto objeto da patente ou, ainda, o produto obtido por processo patenteado. Uma patente de invenção vigora pelo prazo de 20 anos contados a partir da data de seu depósito, enquanto uma patente de modelo de utilidade possui o prazo de 15 anos. Após depositado, o pedido de patente fica em sigilo por 18 meses, quando, então, é publicado. O requerente possui um prazo de 36 meses, a partir da data do depósito, para solicitar o exame do pedido de patente (BRASIL, 1996).

Um relatório descritivo de patente de invenção deve conter os seguintes itens: título, campo da invenção, antecedentes da invenção, descrição das figuras, sumário

da invenção, descrição detalhada da invenção e reivindicações (BRASIL, 2013). A invenção deve ser descrita suficientemente de modo que um técnico no assunto consiga reproduzi-la. Na área farmacêutica, os principais objetos de patente compreendem: moléculas; sais, ésteres e isômeros; síntese; composição; processo de fabricação; uso; polimorfos; tamanho de partículas; dentre outros (GUPTA et al., 2010).

A redação de um pedido de patente requer habilidade pois dentre os três requisitos básicos para sua concessão, o atendimento da atividade inventiva é o mais subjetivo em uma análise por parte do técnico do Instituto Nacional da Propriedade Industrial (INPI). Em uma área como a nanotecnologia, na qual os sistemas normalmente empregados já são apresentados em literatura há muitas décadas, cabe ao redator demonstrar que o invento não decorre de uma aplicação óbvia de conhecimentos já descritos no estado da técnica ou que está ancorada apenas em um novo uso do sistema.

## 2.6 DESENVOLVIMENTO DE MÉTODOS ANALÍTICOS POR DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

O Delineamento Experimental (do inglês *Design of Experiment* ou *DoE*) consiste em um conjunto de experimentos planejados a partir de critérios estatísticos, nos quais os fatores de entrada (variáveis independentes,  $x_i$ ) são combinados e sistematicamente variados para verificar seu impacto sobre respostas de saída (variáveis dependentes,  $y_i$ ), por meio do estabelecimento de modelos matemáticos e de análises estatísticas (FUKUDA et al., 2018). Dessa maneira, é possível: identificar quais fatores de entrada são de fato significativos, ou seja, capazes de alterar as respostas de saída; avaliar a interação entre diferentes fatores de entrada; e, ainda, otimizar os fatores de entrada para gerarem as respostas de saída desejáveis (DHOOT et al., 2019; FUKUDA et al., 2018).

O Delineamento Experimental é um integrante da abordagem *Analytical Quality by Design (AQbD)*, a qual contraria a abordagem empírica de desenvolvimento analítico, baseada na tentativa e no erro e nos experimentos univariados, denominada de *Quality by Testing* (PERAMAN; BHADRAYA; PADMANABHA REDDY, 2015; VERCH et al., 2022). Com o emprego do Delineamento experimental, é possível reduzir o tempo e os custos atrelados ao desenvolvimento e obter métodos

otimizados. Por essas razões, essa ferramenta tem sido cada vez mais empregada na área analítica (PERAMAN; BHADRAYA; PADMANABHA REDDY, 2015).

No desenvolvimento de um método analítico por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE), por exemplo, possíveis fatores de entrada compreendem: constituição da fase orgânica ou fase aquosa; quantidade de fase orgânica ou fase aquosa; pH da fase aquosa; fluxo da fase móvel; volume de injeção; tipo de coluna cromatográfica; temperatura do forno da coluna cromatográfica. Por outro lado, potenciais respostas de saída são: tempo de retenção; resolução de pico; pureza de pico; fator de simetria de pico (GURUMUKHI; BARI, 2022; PATEL et al., 2021; URMI; NAWAZ; ISLAM, 2022). Dessa maneira, pode-se observar que os fatores de entrada constituem variáveis relacionadas às condições de operação do método, enquanto os fatores resposta constituem variáveis relacionadas à qualidade do método, as quais podem ser afetadas por modificações nos fatores de entrada (VERCH et al., 2022).

Existem dois principais tipos de Delineamento Experimental: os de Triagem e os de Otimização (PERAMAN; BHADRAYA; PADMANABHA REDDY, 2015). Os Delineamentos de Triagem mais utilizados são: Fatorial Completo de Dois Níveis, Fatorial Fracionário e Placket-Burman. Já os Delineamentos de Otimização mais empregados compreendem: Fatorial Completo de Três Níveis, Box-Behnken e Composto Central. A escolha do Delineamento a ser empregado dependerá do objetivo do estudo e do número de fatores de entrada requeridos (FUKUDA et al., 2018). Para geração da matriz de experimentos e análise matemática e estatística do Delineamento Experimental se faz necessário o uso de um *software*, sendo que os comumente utilizados são: *Design Expert*<sup>®</sup> e *Minitab*<sup>®</sup> (DHOOT et al., 2019).

Em geral, Delineamentos de Triagem são utilizados com o intuito de verificar ou confirmar quais fatores de entrada são, de fato, críticos para uma ou mais resposta de saída (DHOOT et al., 2019). Sendo assim, os fatores de entrada vistos como não críticos não necessitam ser estudados mais a fundo, uma vez que não possuem impacto sobre a(s) resposta(s) de saída(s). Esse tipo de Delineamento permite estudar um amplo número de fatores com um menor número de experimentos a serem conduzidos. Geralmente, requerem dois níveis para cada fator de entrada (alto e baixo). Entretanto, os Delineamentos de Triagem apresentam algumas limitações, como a impossibilidade de modelar respostas de superfície de segunda ordem e,

adicionalmente, a impossibilidade de modelar a interação entre os fatores de entrada a depender do tipo de Delineamento de Triagem empregado (FUKUDA et al., 2018).

Delineamentos de Otimização, por sua vez, são empregados objetivando determinar os melhores valores ou condições para os fatores de entrada, os quais fornecem os resultados desejáveis para os fatores resposta. Em outras palavras, os Delineamentos de Otimização são utilizados visando otimizar os fatores de entrada (DHOOT et al., 2019). Esse tipo de Delineamento requer um maior número de experimentos, tendo em vista que são necessários no mínimo três níveis para os fatores de entrada (exemplo: baixo, médio e alto), o que permite a obtenção de uma resposta de superfície. Os Delineamentos de Otimização podem permitir a obtenção de um modelo de regressão completo, o qual inclui termos lineares, termos quadráticos e termos de interação. Sendo assim, pode-se primeiramente empregar um Delineamento de Triagem e, em seguida, um de Otimização utilizando apenas os fatores de entrada relevantes detectados pelo Delineamento de Triagem, com o intuito de otimizar esses fatores de entrada (FUKUDA et al., 2018).

Para análise da significância de cada fator de entrada, uma Análise de Variância (ANOVA) deve ser conduzida, a qual compara a variabilidade proveniente da variação dos fatores de entrada em diferentes níveis com a variabilidade proveniente do erro residual. Dessa forma, o modelo de regressão que melhor se adequa aos dados experimentais pode ser selecionado incluindo ou excluindo termos lineares, termos de interação e/ou termos quadráticos, o que é baseado nos resultados da ANOVA. Além disso, a seleção do modelo de regressão deve ser realizada por meio da avaliação do coeficiente de determinação ( $R^2$ ) e do coeficiente de determinação ajustado ( $R^2$ -aju), sendo que esse último é mais adequado para comparação de diferentes modelos. Os Delineamentos de Otimização fornecem, adicionalmente, a análise estatística da falta de ajuste do modelo de regressão, para o qual o erro oriundo da falta de ajuste deve ser significativamente menor que o erro puro aleatório. Ainda, gráficos de Pareto, de Efeitos Principais, de Interações, de Superfície de Resposta e de Contorno podem ser gerados a depender do tipo de Delineamento Experimental adotado, a fim de suportar a interpretação do efeito dos fatores de entrada sobre as respostas de saída (BEZERRA et al., 2008; CANDIOTI et al., 2014; FUKUDA et al., 2018).

Para otimização múltipla dos fatores de entrada diferentes abordagens podem ser empregadas, dentre as quais destaca-se a Função de Desejabilidade. A Função

de Desejabilidade objetiva encontrar os valores ou condições ideais para os fatores de entrada com base nos critérios estabelecidos para as respostas de saída. Seus valores variam de 0 a 1, onde 0 representa uma resposta indesejada e 1 representa uma resposta ideal (BEZERRA et al., 2008; CANDIOTI et al., 2014). O processo de otimização fornece, ainda, os valores preditos para as respostas de saída seus intervalos de predição, os quais devem ser confirmados pela condução de uma análise empregando os fatores de entrada otimizados (CANDIOTI et al., 2014).

## 2.7 VALIDAÇÃO DE MÉTODOS ANALÍTICOS E BIOANALÍTICOS

Novos métodos analíticos ou bioanalíticos desenvolvidos devem ser validados com o intuito de verificar se estão adequados ao uso pretendido e se fornecem resultados fidedignos e confiáveis (GONZÁLEZ et al., 2014; TAVERNIERS; DE LOOSE; VAN BOCKSTAELE, 2004). Para tanto, diferentes Guias podem ser adotados, dentre os quais destacam-se os Guias Q2 para validação analítica e o M10 para validação bioanalítica da Conferência Internacional de Harmonização de Requisitos Técnicos para Produtos Farmacêuticos de Uso Humano (do inglês: *International Council for Harmonization of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use* ou *ICH*). Para validação de um método analítico ou bioanalítico, uma Substância Química de Referência deve ser utilizada para determinação dos parâmetros requeridos (ICH, 2005, 2022).

Os Parâmetros de uma validação analítica a serem determinados dependerão do objetivo do método. Parâmetros tipicamente avaliados em uma validação analítica de um método de teor, por exemplo, incluem: Exatidão, Repetibilidade, Precisão Intermediária, Seletividade, Linearidade e Faixa. Já para validação analítica de um método de determinação de impurezas é necessário avaliar, além dos parâmetros já mencionados, Limite de Detecção (em alguns casos) e Limite de Quantificação (ICH, 2005). Os critérios de aceitação para esses parâmetros devem ser definidos com base no objetivo e na variabilidade intrínseca do método e nas características do analito (TAVERNIERS; DE LOOSE; VAN BOCKSTAELE, 2004).

Métodos bioanalíticos diferem de métodos analíticos pela determinação do analito na presença de uma matriz biológica, como sangue, plasma, urina e, até mesmo, extratos de pele e unha (GONZÁLEZ et al., 2014; KOLIMI et al., 2022; KREUTZ et al., 2018). Além disso, a determinação dos parâmetros geralmente ocorre utilizando-se mais níveis de concentração e um maior número de replicatas para cada



nível. Os parâmetros avaliados em uma validação bioanalítica de um método cromatográfico compreendem: Seletividade, Efeito de Matriz, Curva de Calibração, Faixa, Limite Superior de Quantificação, Limite Inferior de Quantificação, Exatidão, Precisão, Efeito Residual e Recuperação. Ainda, a depender da aplicação do método, outros parâmetros podem ser requeridos, como Integridade de Diluição e Estabilidade de Amostras. Os critérios de aceitação variam para cada parâmetro estão descritos no Guia M10 da ICH (ICH, 2022).

## 2.8 ESTUDOS DE PERMEAÇÃO *IN VITRO* EM MODELO UNGUEAL

A efetividade da terapia tópica ungueal está atrelada à capacidade do composto ativo em permear à unha, de modo que consiga atingir seu sítio de ação. Entretanto, a lâmina ungueal exerce um efeito barreira à entrada de substâncias exógenas, o que atribuído à sua espessura e rigidez e ao alto grau de compactação das moléculas de queratina que a compõem (BAROT et al., 2014; BASWAN et al., 2017). Além disso, as propriedades físico-químicas do composto ativo, como peso molecular, logP, grau de ionização, carga e polaridade influenciam diretamente na sua capacidade de permear através da unha, bem como as características da forma farmacêutica carreadora (SHIVAKUMAR et al., 2012; THATAI; SAPRA, 2014).

Tendo em vista que a lâmina ungueal apresenta um comportamento de “hidrogel” devido à formação de canais polares quando hidratada, substâncias de caráter menos lipofílico ou mais hidrofílico possuem maiores chances de permear. Além disso, substâncias de baixo peso molecular também constituem permeantes potenciais (THATAI; SAPRA, 2014).

Nesse sentido, modelos *in vivo*, *ex vivo* ou *in vitro* capazes de avaliar a permeação ungueal de compostos ativos devem ser adotados durante o desenvolvimento de novas formulações destinadas à aplicação tópica no tratamento de doenças de unha, como as onicomicoses. Modelos *in vitro* podem fornecer resultados que auxiliam no entendimento do perfil de permeabilidade de uma substância e da adequabilidade da formulação desenvolvida. Além disso, são mais acessíveis e adequados à rotina laboratorial em relação aos modelos *in vivo* ou *ex vivo* (THATAI; SAPRA, 2014; THATAI; TIWARY; SAPRA, 2016). Dessa maneira, diversas metodologias *in vitro* para avaliação de permeação ungueal vêm sendo exploradas. No entanto, essas metodologias empregam diferentes membranas biológicas, aparatos e condições, resultando em uma falta de padronização na

literatura para condução de ensaios de permeação ungueal (BHUARTANI; DESHPANDE; PATRAVALE, 2016; ELSAYED, 2015).

Recortes de unhas humanas doadas por voluntários ou recortes de unhas humanas de cadáveres são consideradas o padrão-ouro para estudos de permeação ungueal. Contudo, o uso dessas membranas é dificultado devido aos seus recortes serem pequenos e curvados, sendo requerido o uso de adaptadores especializados de alto custo para o acoplamento ao aparato do ensaio. Além disso, há os aspectos éticos envolvidos (BHUARTANI; DESHPANDE; PATRAVALE, 2016; THATAI; SAPRA, 2014). Dessa forma, pesquisadores têm feito o uso de recortes de cascos animais, principalmente bovinos e suínos, em tamanhos e formatos adaptáveis ao aparato de permeação a ser utilizado (MONTI et al., 2005; MYOUNG; CHOI, 2003; ROCHA et al., 2017).

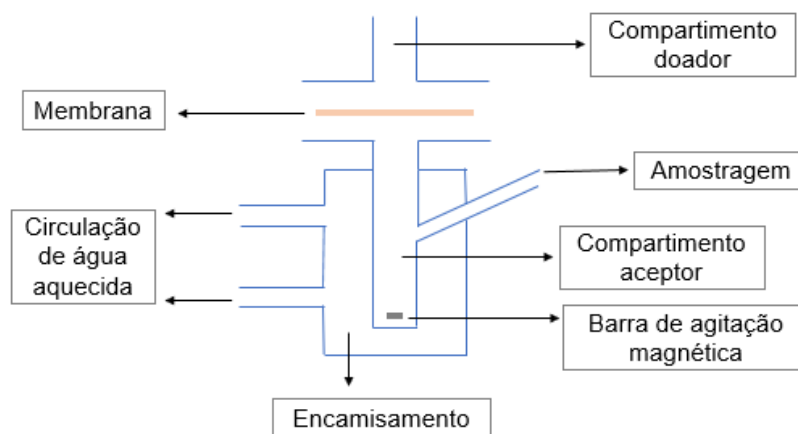
Casos bovinos e suínos apresentam facilidade de obtenção por serem um subproduto de frigoríficos, não necessitando da aprovação por um comitê de ética. Apesar da composição dos cascos desses animais não ser idêntica à da unha humana, é semelhante no que tange a estrutura queratinizada (THATAI; TIWARY; SAPRA, 2016). Cascos bovinos são modelos de unhas mais bem estabelecidos na literatura, porém, alguns estudos também sugerem uma boa correlação entre unhas humanas e cascos suínos (BHUARTANI; DESHPANDE; PATRAVALE, 2016; KIM; LEE; CHOI, 2001).

Independentemente da membrana biológica a ser utilizada, diversos aspectos devem ser estabelecidos, como o modo que será fixada no aparato de permeação, o seu preparo, a padronização da sua espessura e se será hidratada previamente ao ensaio. Nesse sentido, deve-se considerar que o grau de hidratação e a espessura da membrana biológica influenciarão nas suas características de permeabilidade (ELSAIED, 2015; THATAI; TIWARY; SAPRA, 2016).

Células de difusão são geralmente utilizadas como aparato em estudos *in vitro* de permeação ungueal, as quais se subdividem em estáticas e de fluxo. Nas células de difusão estáticas, o fluido acceptor é repostado manualmente; enquanto nas células de difusão de fluxo, o fluido acceptor é bombeado continuamente a um determinado fluxo e repostado automaticamente (THATAI; TIWARY; SAPRA, 2016).

Dentre os modelos estáticos, destaca-se a Célula de Difusão de Franz, que contém dois compartimentos, um doador e outro acceptor, os quais podem estar dispostos horizontalmente (lado a lado) ou verticalmente (em pé). Existem diversos

modelos de Células de Difusão de Franz, os quais apresentam diferentes dimensões externas e internas e desenhos, geralmente adaptados de acordo com as particularidades de cada estudo (SHIVAKUMAR et al., 2012; THATAI; TIWARY; SAPRA, 2016). A Figura 5 ilustra a estrutura básica de uma Célula Difusão de Franz estática vertical encamisada.



**Figura 5.** Esquema representativo de uma Célula de Difusão de Franz estática vertical encamisada.

Fonte: elaborada pelo próprio autor, 2023.

Conforme pode ser observado na Figura 5, o compartimento doador é o local no qual a formulação a ser testada é inserida. Caso o composto ativo seja permeável à membrana biológica, atingirá o compartimento receptor. Tipicamente, para estudos de permeação ungueal a área de difusão do compartimento doador corresponde a 0,2 cm<sup>2</sup> (KOLIMI et al., 2022; ROCHA et al., 2017). A membrana biológica é fixada entre os dois compartimentos, podendo-se utilizar adaptadores de teflon ou outras técnicas para auxiliar no seu posicionamento (SHIVAKUMAR et al., 2012).

O compartimento receptor geralmente possui um volume de 5 mL e é preenchido por uma solução tampão de pH igual ou próximo ao fisiológico (7,4), a qual pode ser acrescida de um promotor de solubilidade do composto ativo, como um tensoativo ou etanol (AMICHAH et al., 2010; GÓMEZ et al., 2018; KOLIMI et al., 2022). O composto ativo deve ser solúvel no fluido receptor, mantendo-se a Condição Sink, que prega que o volume de meio deve ser, no mínimo, três vezes o volume necessário para se obter uma solução saturada do composto ativo (PHILLIPS et al., 2012).

Além disso, o fluido receptor deve ser mantido em agitação constante, comumente empregando-se a agitação magnética. O encamisamento da Célula de

Franz permite manter constante a temperatura do fluido acceptor pela circulação de água aquecida, comumente a 32 °C. Em intervalos de tempo determinados, uma amostra do fluido acceptor é recolhida para a quantificação do composto ativo permeado, devendo-se repor o volume retirado com fluido acceptor fresco caso se trabalhe com um aparato estático (MONTI et al., 2005). Ao final do ensaio, o composto ativo é extraído da membrana biológica para quantificação, de modo a verificar a sua retenção (AHN et al., 2013).

Diferentes procedimentos são descritos em literatura para realizar a extração do composto de interesse da membrana biológica em estudos de permeação ungueal. A maioria dos estudos utiliza a digestão alcalina com hidróxido de sódio e/ou o tratamento com solventes orgânicos, como etanol, metanol e clorofórmio (AHN et al., 2013; MONTI et al., 2005; ROCHA et al., 2017). Além disso, o tempo total de ensaio varia para cada estudo, podendo durar de 24 até 168 horas ou mais, a depender das características de permeabilidade do composto ativo, da membrana biológica empregada, da forma farmacêutica e do uso clínico pretendido (GÓMEZ et al., 2018; KOLIMI et al., 2022; NGUYEN; BANGA, 2018). Sendo assim, pode-se constatar que diversos aspectos devem ser definidos.

## 2.9 ESTUDOS DE ATIVIDADE ANTIFÚNGICA EM MODELO UNGUEAL

No desenvolvimento de uma nova formulação farmacêutica se faz necessário avaliar sua eficácia, de modo a levantar evidências de que está adequada à finalidade terapêutica pretendida. No caso de formulações tópicas que visam tratar infecções fúngicas ungueais, diversos ensaios para avaliação da sua atividade antifúngica podem ser executados, sendo o mais corriqueiro o ensaio *in vitro* de Concentração Inibitória Mínima (do inglês *Minimum Inhibitory Concentration* ou *MIC*) pelo método de microdiluição em caldo descrito pelo *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI) (BORMAN et al., 2017).

No entanto, os ensaios de Concentração Inibitória Mínima não apresentam as interferências fisiológicas e a microestrutura do local da infecção e não são capazes de simular o uso clínico da formulação que está sendo testada. Nesse sentido, Quatrin e colaboradores (2020) desenvolveram uma nova metodologia para avaliação da atividade antifúngica de formulações destinadas à administração ungueal, a qual emprega modelos de unha infectados com o principal fungo dermatófito causador de onicomicoses (QUATRIN et al., 2020).

Para esse ensaio, membranas de 9,5 mm de diâmetro e de 1 mm de espessura são formadas a partir de cascos suínos e posteriormente autoclavadas para remoção da contaminação microbiológica. Em seguida, em meio de cultura ágar Batata Dextrose, as membranas obtidas são infectadas com 100 µL de uma suspensão fúngica de *Trichophyton rubrum* a  $10^5$  UFC/mL e incubadas por 5 dias a 32 °C. Após, são transferidas para meio de cultura ágar Sabouraud Dextrose para iniciar o período de tratamento, no qual uma quantidade apropriada da formulação teste é aplicada diariamente sobre as membranas infectadas por 7 dias. Decorrido esse período, o percentual de remoção das células fúngicas é calculado para formulação teste em relação ao crescimento fúngico obtido para o controle positivo, o qual é infectado com *Trichophyton rubrum* sob as mesmas condições, porém não recebe nenhum tipo de tratamento. Para tanto, as membranas são transferidas para tubo contendo solução salina, submetidas ao vórtex e, em seguida, à ultrasonicação. São pipetados, então, 20 µL da suspensão fúngica obtida para o meio de cultura ágar Batata Dextrose, o qual é incubado à 32 °C por período específico para permitir a contagem das unidades formadoras de colônia (UFC) (QUATRIN et al., 2020).

Além disso, uma análise de recidiva também é conduzida com o objetivo de verificar se as células fúngicas sobreviveram dentro das membranas. Para esse propósito, após o procedimento de lavagem em solução salina conforme descrito acima, as membranas são transferidas para ágar Batata Dextrose e incubadas de modo a verificar visualmente a presença ou a ausência de crescimento fúngico (LUSIANA; REICHL; MÜLLER-GOYMANN, 2013; QUATRIN et al., 2020).

Quatrin e colaboradores (2020) aplicaram o ensaio desenvolvido para avaliação do potencial antifúngico de esmalte contendo terbinafina e de esmalte contendo 3-selenocianato-indol, para os quais resultados promissores foram obtidos. Esse ensaio em modelo ungueal simula uma situação real de infecção, propiciando obter uma condição semelhante à das onicomicoses. Os cascos suínos possuem uma estrutura queratinizada que atua como suporte nutricional para o crescimento fúngico, assim como ocorre nas unhas humanas infectadas (BRAGULLA; HOMBERGER, 2009).



**ARTIGO CIENTÍFICO**

**Development by Design of Experiment and validation of a HPLC-UV method for simultaneous quantification of 1-nitro-2-phenylethane and methyleugenol: Application to nail permeation/retention studies**

---

Artigo científico submetido ao periódico *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* (fator de impacto 3.4)





### **3. ARTIGO CIENTÍFICO - Development by Design of Experiment and validation of a HPLC-UV method for simultaneous quantification of 1-nitro-2-phenylethane and methyleugenol: Application to nail permeation/retention studies**

O texto deste capítulo, que na versão completa da dissertação defendida ocupa o intervalo de páginas compreendido entre 48 – 91, foi suprimido por tratar-se de manuscrito de artigo científico submetido para publicação ao periódico *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. Este artigo aborda: o desenvolvimento de um método analítico por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) para determinação simultânea de 1-nitro-2-feniletano e metileugenol, empregando os Delineamentos Experimentais (DoE) Fatorial Completo  $2^3$  e Box-Behnken; a validação desse método para quantificação dos composto de interesse em amostras de fluido acceptor e de extrato metanólico de casco suíno; estudos de permeação/retenção utilizando membranas obtidas a partir de cascos suínos como modelo de unha para o óleo essencial de *Aniba canelilla* (Kunth) Mez veiculado em *blend* contendo óleo mineral e Span 80. O método analítico desenvolvido apresentou baixos tempos de retenção para os analitos e foi validado em uma ampla faixa, atendendo aos parâmetros preconizados pelos Guias ICH Q2(R1) e ICH M10. Nos estudos de permeação/retenção verificou-se que o 1-nitro-2-feniletano atingiu o fluido acceptor, enquanto o metileugenol permaneceu retido na membrana biológica.





































































































## ARTIGO CIENTÍFICO

***Aniba canelilla* (Kunth) Mez essential oil entrapped in nanostructured lipid carrier and aqueous nail polish containing this nanostructure for the management of onychomycosis: unguinal/transungual delivery and antifungal activity by a novel infected nail model**

---

Artigo científico a ser submetido para publicação em periódico de circulação internacional.





**4. ARTIGO CIENTÍFICO - *Aniba canelilla* (Kunth) Mez essential oil entrapped in nanostructured lipid carrier and aqueous nail polish containing this nanostructure for the management of onychomycosis: unguual/transungual delivery and antifungal activity by a novel infected nail model**

O texto deste capítulo, que na versão completa da dissertação defendida ocupa o intervalo de páginas compreendido entre 96 – 125, foi suprimido por tratar-se de manuscrito de artigo científico a ser submetido para publicação em periódico de circulação internacional. Este artigo aborda: a produção e caracterização de carreador lipídico nanoestruturado contendo o óleo essencial de *Aniba canelilla* (Kunth) Mez e de esmalte aquoso contendo essa mesma nanoestrutura; estudos de permeação/retenção em modelo ungueal para as formulações; estudos de atividade antifúngica em modelo ungueal infectado com *Trichophyton rubrum* para as formulações. Foi verificado que o 1-nitro-2-feniletano permeou para o fluido acceptor, enquanto o metileugenol permaneceu retido na membrana biológica. Ambas a formulações apresentaram atividade antifúngica.







































































## **DISCUSSÃO E CONCLUSÃO**

---



## 5. DISCUSSÃO

As onicomicoses constituem uma doença de difícil tratamento e que requerem novas alternativas terapêuticas (DHAMOON; POPLI; GUPTA, 2019). Os medicamentos orais atualmente disponíveis apresentam efeitos adversos e interações medicamentosas. Por outro lado, os medicamentos tópicos requerem um longo período de tratamento e estão associados a chances de recidivas (LIPNER; SCHER, 2019b).

Considerando esse cenário, nosso grupo de pesquisa desenvolveu previamente um carreador lipídico nanoestruturado contendo o óleo essencial de *Aniba canelilla* (CLN<sub>OEAC</sub>) e um esmalte aquoso contendo essa mesma nanoestrutura (E-CLN<sub>OEAC</sub>) visando propor novas alternativas para o manejo tópico de onicomicoses. O desenvolvimento dessas formulações foi realizado no âmbito de uma tese de doutorado (KREUTZ, 2021). Já os estudos de efetividade da terapia tópica em modelo ungueal infectado com *Trichophyton rubrum* foram realizados no âmbito desta dissertação de mestrado. Tendo em vista os excelentes resultados obtidos, e que as formulações nanotecnológicas (CLN<sub>OEAC</sub> e E-CLN<sub>OEAC</sub>) cumpriam com os requisitos de novidade, atividade inventiva e aplicação industrial (BRASIL, 1996), um pedido de patente de invenção foi redigido e depositado no Instituto Nacional da Propriedade Industrial (INPI), sob número de processo BR1020220247790 (KOESTER et al., 2022).

Para que pudessem ser investigadas as propriedades de permeação ungueal dos compostos majoritários presentes no óleo essencial de *Aniba canelilla*, fazia-se necessário implementar um protocolo para condução de estudos de permeação em modelo ungueal, assim como desenvolver uma metodologia analítica capaz de quantificar com confiabilidade o 1-nitro-2-feniletano e o metileugenol em amostras de fluido acceptor e de extrato proveniente da membrana biológica.

O desenvolvimento de um novo método analítico por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) requer a determinação de diversas variáveis, especialmente quando se visa a quantificação simultânea de dois compostos. Nesse sentido, o Delineamento Experimental (DoE) se mostra uma ferramenta útil, auxiliando a reduzir os custos e o tempo associados ao desenvolvimento, assim como a atingir um método otimizado (POLITIS et al., 2017).

Dois Delineamentos Experimentais foram empregados visando o desenvolvimento de um método analítico por CLAE para quantificação de 1-nitro-2-feniletano e metileugenol: Fatorial Completo  $2^3$  para triagem de variáveis e Box-Behnken para otimização. A partir do Fatorial Completo  $2^3$  pode-se definir a constituição da fase orgânica e o pH da fase móvel. Após a condução do Box-Behnken, as seguintes variáveis foram otimizadas: percentual de fase orgânica, fluxo da fase móvel e volume de injeção. O método desenvolvido gerou um baixo tempo de retenção para os analitos, 5,65 minutos para o 1-nitro-2-feniletano e 7,49 para o metileugenol, resultando em um tempo de corrida inferior a 10 minutos.

Após o desenvolvimento do método, duas validações foram realizadas visando a quantificação dos compostos de interesse em amostras de estudos de permeação em modelo ungueal. Uma validação analítica foi realizada para quantificação dos analitos nas coletas de fluido acceptor, seguindo-se os seguintes parâmetros recomendados pelo Guia ICH Q2(R1): Seletividade; Limites de Detecção e Quantificação; Linearidade e Faixa; Precisão e Exatidão (ICH, 2005).

Já para quantificação dos analitos no extrato metanólico de casco suíno, uma validação bioanalítica foi conduzida tendo em vista a matriz biológica presente nessa amostra. Para tanto, seguiu-se o preconizado pela diretriz ICH M10, adotando-se os seguintes parâmetros: Seletividade; Efeito de Matriz; Curva de Calibração e Faixa; Exatidão e Precisão; Efeito Residual e Recuperação (ICH, 2022). Os resultados de todos os parâmetros das validações analítica e bioanalítica foram satisfatórios e o método foi considerado validado em uma ampla faixa, de 0,6 a 200,0  $\mu\text{g/mL}$  para o 1-nitro-2-feniletano e de 0,2 a 40,0 para o metileugenol.

Há uma falta de padronização na literatura acerca de estudos *in vitro* de permeação em modelo ungueal. Sendo assim, diversos parâmetros devem ser determinados, como a escolha da membrana biológica e seu preparo, o aparato a ser utilizado, o modo de fixar a membrana biológica no aparato e o tempo de ensaio (THATAI; SAPRA, 2014). Cascos suínos foram escolhidos como modelo ungueal pois estudos demonstram uma correlação adequada com a unha humana (KIM; LEE; CHOI, 2001). Adicionalmente, cascos suínos possibilitam a formação de membranas com diâmetro e espessura adequados à colocação entre os compartimentos doador e receptor de uma célula de difusão de Franz, sem a necessidade da utilização de um adaptador específico (BHUPTANI; DESHPANDE; PATRAVALE, 2016; THATAI; TIWARY; SAPRA, 2016).

Células de difusão de Franz foram confeccionadas sob demanda, contendo 0,2 cm<sup>2</sup> de diâmetro de difusão e 5 mL de volume de compartimento receptor, com base em dados de literatura (KOLIMI et al., 2022; ROCHA et al., 2017). Para fixação da membrana biológica na célula de Franz, utilizou-se cola de silicone e Parafilm<sup>®</sup>. Além disso, previamente ao estudo de permeação, foi necessário realizar a hidratação das membranas biológicas por 12 horas em tampão fosfato-salino (pH 7,4) para reduzir a sua rigidez e sua curvatura. Dessa forma, uma metodologia para condução de estudos *in vitro* de permeação em modelo ungueal foi concebida.

Com o intuito de aplicar o método analítico desenvolvido, estudos *in vitro* de permeação/retenção utilizando membranas preparadas a partir de cascos suínos foram realizados para o óleo essencial de *Aniba canelilla* diluído em óleo mineral (10% p/p, sendo acrescido 2,5% p/p de Span 80). Foram considerados três tempos de duração diferentes para os ensaios: 24, 48 e 72 horas. Foi observado um possível mecanismo de saturação da membrana biológica já nas primeiras 24 horas, tendo em vista que não houve diferença estatística entre a quantidade de analito retida na membrana nos tempos de 24, 48 e 72 horas, tanto para o 1-nitro-2-feniletano, quanto para o metileugenol. Além disso, o 1-nitro-2-feniletano foi quantificado no fluido acceptor já em 24 horas, sendo observado uma quantidade crescente permeada nos demais pontos de coleta. Um efeito promotor de permeação é atribuído ao Span 80, uma vez que é sabido que tensoativos apresentam essa propriedade por serem capazes de interagir com a queratina (MALHOTRA; ZATZ, 2002).

A efetividade da terapia tópica de onicomicoses depende da capacidade do composto ativo em permear a unha para atingir seu sítio de ação (BAROT et al., 2014). Sendo assim, estudos *in vitro* de permeação/retenção em modelo ungueal foram realizados para o carreador lipídico nanoestruturado contendo o óleo essencial de *Aniba canelilla* (CLN<sub>OEAC</sub>) e para o esmalte aquoso contendo essa nanoestrutura (E-CLN<sub>OEAC</sub>). Além disso, o óleo essencial de *Aniba canelilla* bruto foi considerado como grupo controle. Foram realizados três experimentos para cada grupo, considerando-se os tempos de duração de 24, 48 e 72 horas.

Verificou-se que o 1-nitro-2-feniletano do CLN<sub>OEAC</sub> foi capaz de atingir o fluido acceptor em apenas 8 horas, apresentando uma quantidade crescente permeada ao longo de 72 horas. A permeação para o fluido acceptor é interessante sob o ponto de vista de tratar onicomicoses pois pode indicar que o composto ativo é capaz de atingir

o leito ungueal, sítio de infecção de diversos subtipos clínicos dessa doença (BAROT et al., 2014; LEUNG et al., 2019). Em 72 horas, a quantidade cumulativa de 1-nitro-2-feniletano permeada para o fluido acceptor proveniente do CLN<sub>OEAC</sub> foi mais que o dobro da quantidade cumulativa do grupo controle, justificando o emprego da nanotecnologia para otimizar as propriedades de permeação.

Por outro lado, foi constatado um perfil de retenção na membrana biológica semelhante para CLN<sub>OEAC</sub> e para o grupo controle, o que é atribuído às propriedades físico-químicas favoráveis à penetração do 1-nitro-2-feniletano e metileugenol. O 1-nitro-2-feniletano apresenta massa molecular de 151 Da e logP de 2,1, enquanto o metileugenol apresenta massa molecular de 178 Da e logP de 2,5 (NATIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION, 2023a, 2023b).

Uma menor quantidade de 1-nitro-2-feniletano e metileugenol retida na membrana biológica e de 1-nitro-2-feniletano permeada para o fluido acceptor foi observada para o E-CLN<sub>OEAC</sub> em comparação aos demais grupos. A base de esmalte empregada para redispersão do CLN<sub>OEAC</sub> liofilizado apresenta uma composição polimérica, a qual, possivelmente, controla a liberação das nanopartículas, explicando os resultados obtidos. No entanto, um esmalte constitui a forma farmacêutica ideal para aplicação sobre as unhas, uma vez que forma um filme e aumenta o tempo de residência do composto ativo no local da aplicação (THATAI; SAPRA, 2018).

No desenvolvimento de formulações tópicas que visam o tratamento de onicomicoses, estudos de atividade antifúngica em modelo ungueal mostram-se mais eficientes do que estudo de Concentração Inibitória Mínima pois são capazes de simular a microestrutura da unha humana e de propiciar uma condição real de infecção (QUATRIN et al., 2020). Estudos de atividade antifúngica em cascos suínos infectados com *Trichophyton rubrum* foram conduzidos para o CLN<sub>OEAC</sub> e o E-CLN<sub>OEAC</sub>. Além disso, as formulações brancas, produzidas sem o óleo essencial de *Aniba canelilla*, e o óleo essencial de *Aniba canelilla* diluído em óleo mineral (10%, p/p) foram considerados como grupos controle.

Ambas as formulações (CLN<sub>OEAC</sub> e E-CLN<sub>OEAC</sub>) apresentaram alto percentual de remoção das células fúngicas, demonstrando seu potencial frente a onicomicoses. Além disso, não houve crescimento fúngico na análise da recidiva para o CLN<sub>OEAC</sub>. O óleo essencial de *Aniba canelilla* diluído em óleo mineral também apresentou alto percentual de remoção das células fúngicas, sem a presença de recidiva,

comprovando sua atividade antifúngica e justificando seu emprego nas formulações como composto ativo.

Por outro lado, houve crescimento fúngico na análise da recidiva para o E-CLN<sub>OEAC</sub>, o que é atribuído, novamente, à composição polimérica da base de esmalte, a qual controla a liberação das nanopartículas e, possivelmente, retarda seu contato com as células fúngicas. Sendo, assim, é sugerido um maior período de tratamento com a formulação, tendo em vista que foi realizado um tratamento das membranas infectadas por apenas 7 dias.

As formulações brancas também apresentaram percentuais de remoção de células fúngicas, apesar de que consideravelmente menores quando em comparação aos percentuais obtidos para as formulações, o que é atribuído a sua capacidade de dificultar o aporte nutricional do fungo quando aplicadas sobre a membrana de casco suíno. Além disso, todas as formulações brancas apresentaram crescimento fúngico na análise da recidiva.





## 6. CONCLUSÃO

Um pedido de patente de invenção para o carreador lipídico nanoestruturado contendo o óleo essencial de *Aniba canelilla* (CLN<sub>OEAC</sub>) e para o esmalte aquoso contendo essa nanoestrutura (E-CLN<sub>OEAC</sub>) foi redigido e depositado no Instituto Nacional da Propriedade Industrial (INPI). Um método analítico rápido foi desenvolvido por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência para quantificação simultânea de 1-nitro-2-feniletano e metileugenol em amostras de estudos de permeação/retenção em modelo ungueal. O método foi completamente validado de acordo com os parâmetros recomendados pelas diretrizes ICH Q2(R1) e ICH M10, em uma ampla faixa. Estudos *in vitro* de permeação/retenção em modelo ungueal demonstraram que o 1-nitro-2-feniletano proveniente do CLN<sub>OEAC</sub> e do E-CLN<sub>OEAC</sub> foi capaz de atingir o fluido acceptor. Além disso, uma quantidade considerável de 1-nitro-2-feniletano e metileugenol permaneceu retida na membrana biológica em 24, 48 e 72 horas. Estudos de atividade antifúngica em modelo ungueal demonstraram o potencial antifúngico de ambas as formulações, as quais apresentaram alto percentual de remoção das células fúngicas de *Trichophyton rubrum*. Tais achados demonstram que as formulações nanotecnológicas (CLN<sub>OEAC</sub> e E-CLN<sub>OEAC</sub>) apresentam potencial para o manejo tópico de onicomicoses. Estudos futuros são necessários para avaliar a eficácia clínica dessas formulações.



## REFERÊNCIAS

- ADAMS, R. P. **Identification of Essential Oil Components by Gas Chromatography/Mass Spectrometry**. 4. ed. Carol Stream, Illinois, USA: Allured Publishing Corp, 2007.
- AHAD, A.; AQIL, M.; ALI, A. The application of anethole, menthone, and eugenol in transdermal penetration of valsartan: Enhancement and mechanistic investigation. **Pharmaceutical Biology**, v. 54, n. 6, p. 1042–1051, 2 jun. 2016.
- AHN, T. S. et al. Effect of pressure sensitive adhesive and vehicles on permeation of terbinafine across porcine hoof membrane. **Archives of Pharmacal Research**, v. 36, n. 11, p. 1403–1409, nov. 2013.
- AKHTAR, N.; SHARMA, H.; PATHAK, K. Onychomycosis: Potential of Nail Lacquers in Transungual Delivery of Antifungals. **Scientifica**, v. 2016, 2016.
- AMICHAÏ, B. et al. Iontophoretic terbinafine HCL 1.0% delivery across porcine and human nails. **Mycopathologia**, v. 169, n. 5, p. 343–349, maio 2010.
- ARAUJO, V. H. S. et al. Exploiting solid lipid nanoparticles and nanostructured lipid carriers for drug delivery against cutaneous fungal infections. **Critical Reviews in Microbiology**, v. 47, n. 1, p. 79–90, 2021.
- ASBAHANI, A. EL et al. Essential oils: From extraction to encapsulation. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 483, n. 1–2, p. 220–243, 15 abr. 2015.
- BAROT, B. S. et al. Drug Delivery to the Nail: Therapeutic Options and Challenges for Onychomycosis. **Critical Reviews™ in Therapeutic Drug Carrier Systems**, n. 6, p. 459–494, 2014.
- BASWAN, S. et al. Understanding the formidable nail barrier: A review of the nail microstructure, composition and diseases. **Mycoses**, v. 60, n. 5, p. 284–295, 1 maio 2017.
- BEZERRA, M. A. et al. Response surface methodology (RSM) as a tool for optimization in analytical chemistry. **Talanta**, v. 76, n. 5, p. 965–977, 15 set. 2008.
- BHUPTANI, R. S.; DESHPANDE, K. M.; PATRAVALE, V. B. Transungual permeation: current insights. **Drug Delivery and Translational Research**, v. 6, n. 4, p. 426–439, 1 ago. 2016.
- BORMAN, A. M. et al. MIC distributions and evaluation of fungicidal activity for amphotericin B, itraconazole, voriconazole, posaconazole and caspofungin and 20 species of pathogenic filamentous fungi determined using the CLSI broth microdilution method. **Journal of Fungi**, v. 3, n. 2, 1 jun. 2017.
- BRAGULLA, H. H.; HOMBERGER, D. G. Structure and functions of keratin proteins in simple, stratified, keratinized and cornified epithelia. **Journal of Anatomy**, v. 214, n. 4, p. 516–559, 2009.

BRASIL. **Lei nº 9.279 de 14 de maio de 1996. Regula direitos e obrigações relativos à propriedade industrial.** Presidência da República Casa Civil, Subchefia para Assuntos Jurídicos, 1996.

BRASIL. **Instrução Normativa nº 30 de 2013. Estabelecimento de normas gerais de procedimentos para explicitar e cumprir dispositivos da Lei de Propriedade Industrial - Lei nº 9279, de 14 de maio de 1996, no que se refere às especificações dos pedidos de patente.** Ministério do Desenvolvimento, Indústria e Comércio Exterior, Instituto Nacional da Propriedade Industrial (INPI), 2013.

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

CANDIOTI, L. V. et al. Experimental design and multiple response optimization. Using the desirability function in analytical methods development. **Talanta**, v. 124, p. 123–138, 15 jun. 2014.

DA SILVA, J. K. R. et al. Antioxidant capacity and cytotoxicity of essential oil and methanol extract of Aniba canelilla (H.B.K.) Mez. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 55, n. 23, p. 9422–9426, 14 nov. 2007.

DA TRINDADE, R. C. S. et al. Chemical diversity and therapeutic effects of essential oils of Aniba species from the amazon: A review. **Plants**, v. 10, n. 9, p. 1854, 1 set. 2021.

DE SIQUEIRA, R. J. B. et al. 1-Nitro-2-phenylethane, the main constituent of the essential oil of Aniba canelilla, elicits a vago-vagal bradycardiac and depressor reflex in normotensive rats. **European Journal of Pharmacology**, v. 638, n. 1–3, p. 90–98, jul. 2010.

DEYNO, S. et al. Essential oils as topical anti-infective agents: A systematic review and meta-analysis. **Complementary Therapies in Medicine**, v. 47, 1 dez. 2019.

DHAMOON, R. K.; POPLI, H.; GUPTA, M. Novel Drug Delivery Strategies for the Treatment of Onychomycosis. **Pharmaceutical Nanotechnology**, v. 7, n. 1, p. 24–38, 10 maio 2019.

DHOOT, A. S. et al. Design of Experiments in Pharmaceutical Development. **Pharmaceutical Chemistry Journal**, v. 53, n. 8, p. 730–735, 2019.

ELSAYED, M. M. A. Development of topical therapeutics for management of onychomycosis and other nail disorders: A pharmaceutical perspective. **Journal of Controlled Release**, v. 199, p. 132–144, 10 fev. 2015.

EL-SHERIF, N. I.; SHAMMA, R. N.; ABDELBAR, G. In-situ gels and nail lacquers as potential delivery systems for treatment of onychomycosis. A comparative study. **Journal of Drug Delivery Science and Technology**, v. 43, p. 253–261, 1 fev. 2018a.

EL-SHERIF, N. I.; SHAMMA, R. N.; ABDELBAR, G. In-situ gels and nail lacquers as potential delivery systems for treatment of onychomycosis. A comparative study.

**Journal of Drug Delivery Science and Technology**, v. 43, p. 253–261, 1 fev. 2018b.

FANG, C.-L.; AL-SUWAYEH, S. A.; FANG, J.-Y. Nanostructured Lipid Carriers (NLCs) for Drug Delivery and Targeting. **Recent Patents on Nanotechnology**, v. 7, p. 41–55, 2013.

FLORES, F. C. et al. An innovative polysaccharide nanobased nail formulation for improvement of onychomycosis treatment. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 100, p. 56–63, 30 mar. 2017.

FUKUDA, I. M. et al. **Design of experiments (DoE) applied to pharmaceutical and analytical quality by design (QbD)**. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences** Faculdade de Ciências Farmaceuticas (Biblioteca), , 2018.

GHANNOUM, M. A. et al. Ability of hydroxypropyl Chitosan nail lacquer to protect against dermatophyte nail infection. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 59, n. 4, p. 1844–1848, 1 abr. 2015.

GIONGO, J. L. et al. Trypanocidal activity of the compounds present in Aniba canelilla oil against *Trypanosoma evansi* and its effects on viability of lymphocytes. **Microbial Pathogenesis**, v. 103, p. 13–18, 1 fev. 2017.

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

GONZÁLEZ, O. et al. Bioanalytical chromatographic method validation according to current regulations, with a special focus on the non-well defined parameters limit of quantification, robustness and matrix effect. **Journal of Chromatography A**, v. 1353, p. 10–27, 1 ago. 2014.

GRUMBT, M. et al. Keratin degradation by dermatophytes relies on cysteine dioxygenase and a sulfite efflux pump. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 133, n. 6, p. 1550–1555, 2013.

GUPTA, A. K. et al. Onychomycosis: a review. **Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology**, v. 34, n. 9, p. 1972–1990, 1 set. 2020.

GUPTA, H. et al. Patent protection strategies. **Journal of Pharmacy and Bioallied Sciences**, v. 2, n. 1, p. 2–7, 2010.

GURUMUKHI, V. C.; BARI, S. B. Quantification and Validation of Stability-Indicating RP-HPLC Method for Efavirenz in Bulk and Tablet Dosage Form using Quality by Design (QbD): A Shifting Paradigm. **Journal of Chromatographic Science**, v. 60, n. 2, p. 143–156, 1 fev. 2022.

ICH. International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceutical for Human Use. **ICH Harmonised Tripartite Guideline, Validation of Analytical Procedures: text and methodology Q2(R1)**. 2005. Disponível em:

<<https://database.ich.org/sites/default/files/Q2%28R1%29%20Guideline.pdf>>. Acesso em: 2 ago. 2023.

ICH. International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceutical for Human Use. **ICH Harmonised Guideline, Bioanalytical Method Validation and Study Sample Analysis M10**. 2022.

Disponível em:

<[https://database.ich.org/sites/default/files/M10\\_Guideline\\_Step4\\_2022\\_0524.pdf](https://database.ich.org/sites/default/files/M10_Guideline_Step4_2022_0524.pdf)>. Acesso em: 2 ago. 2023.

KATOPODI, A.; DETSI, A. Solid Lipid Nanoparticles and Nanostructured Lipid Carriers of natural products as promising systems for their bioactivity enhancement: The case of essential oils and flavonoids. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 630, 5 dez. 2021.

KHOSRAVI, A. R.; SHOKRI, H.; SAFFARIAN, Z. Anti-fungal activity of some native essential oils against emerging multi-drug resistant human nondermatophytic moulds. **Journal of Herbal Medicine**, v. 26, n. 5, p. 556–565, 1 out. 2020.

KIM, J.-H.; LEE, C. H.; CHOI, H.-K. A Method to Measure the Amount of Drug Penetrated across the Nail Plate. **Pharmaceutical Research**, v. 18, n. 10, p. 1468–1471, 2001.

KOESTER, L. S. et al. **Composição de carreador lipídico nanoestruturado contendo 1-nitro-2-feniletano, processo de obtenção e uso para o tratamento de dermatofitoses**. Depositante: Universidade Federal do Rio Grande do Sul; Fundação Universidade do Amazonas. BR1020220247790. Depósito: 2 dez. 2022.

KOLIMI, P. et al. Development and Validation of HPLC Method for Efinaconazole: Application to Human Nail Permeation Studies. **AAPS PharmSciTech**, v. 23, n. 1, 1 jan. 2022.

KREUTZ, T. et al. Optimization, validation and application of headspace solid-phase microextraction gas chromatography for the determination of 1-nitro-2-phenylethane and methyleugenol from Aniba canelilla (H.B.K.) Mez essential oil in skin permeation samples. **Journal of Chromatography A**, v. 1564, p. 163–175, 24 ago. 2018.

KREUTZ, T. **Sistemas nanoestruturados para liberação de óleo essencial de casca-preciosa (Aniba canelilla (Kunth) Mez) visando aplicação cutânea e ungueal**. 2021. 355 f. Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas) – Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2021.

KREUTZ, T. et al. Aniba canelilla (Kunth) Mez essential oil-loaded nanoemulsion: Improved stability of the main constituents and in vitro antichemotactic activity. **Industrial Crops and Products**, v. 171, p. 113949, 1 nov. 2021.

KREUTZ, T. et al. Hydrogel-thickened nanoemulsion containing amazonian Aniba canelilla (Kunth) Mez essential oil: Skin permeation and in vivo anti-inflammatory efficacy. **Journal of Drug Delivery Science and Technology**, v. 87, p. 104771, set. 2023.

- LAKSHMI, P.; KUMAR, G. A. Nano-suspension Technology: a review. **International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**, v. 2, n. 4, p. 35–40, 2010.
- LEUNG, A. K. C. et al. Onychomycosis: An Updated Review. **Recent Patents on Inflammation & Allergy Drug Discovery**, v. 14, n. 1, p. 32–45, 18 nov. 2019.
- LEUNG, A. K. C. et al. Onychomycosis: An Updated Review. **Recent Patents on Inflammation & Allergy Drug Discovery**, v. 14, n. 1, p. 32–45, 18 nov. 2020.
- LIMA, M. DA P. et al. Essential oil composition of leaf and fine stem of Aniba canelilla (Kunth) Mez from Manaus, Brazil. **Acta Amazonica**, v. 34, n. 2, p. 329–330, 2004.
- LIPNER, S. R.; SCHER, R. K. Onychomycosis: Clinical overview and diagnosis. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 80, n. 4, p. 835–851, 1 abr. 2019a.
- LIPNER, S. R.; SCHER, R. K. Onychomycosis: Treatment and prevention of recurrence. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 80, n. 4, p. 853–867, 1 abr. 2019b.
- LUCCA, L. G. et al. Determination of  $\beta$ -caryophyllene skin permeation/retention from crude copaiba oil (*Copaifera multijuga* Hayne) and respective oil-based nanoemulsion using a novel HS-GC/MS method. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 104, p. 144–148, 1 fev. 2015.
- LUNARDI, C. N. et al. Experimental methods in chemical engineering: Zeta potential. **Canadian Journal of Chemical Engineering**, v. 99, n. 3, p. 627–639, 1 mar. 2021.
- LUSIANA; REICHL, S.; MÜLLER-GOYMANN, C. C. Infected nail plate model made of human hair keratin for evaluating the efficacy of different topical antifungal formulations against *Trichophyton rubrum* in vitro. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 84, n. 3, p. 599–605, ago. 2013.
- MAHTAB, A. et al. Transungual Delivery of Ketoconazole Nanoemulgel for the Effective Management of Onychomycosis. **AAPS PharmSciTech**, v. 17, n. 6, p. 1477–1490, 1 dez. 2016.
- MALHOTRA, G. G.; ZATZ, J. L. Investigation of Nail Permeation Enhancement by Chemical Modification Using Water as a Probe. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 91, n. 02, p. 312–323, 2002.
- MANHÃES, A. P. et al. Biomass production and essential oil yield from leaves, fine stems and resprouts using pruning the crown of Aniba canelilla (H.B.K.) (Lauraceae) in the Central Amazon. v. 42, n. 3, p. 355–362, 2012.
- MARTÍNEZ-MONTEAGUDO, S. I.; YAN, B.; BALASUBRAMANIAM, V. M. Engineering Process Characterization of High-Pressure Homogenization—from Laboratory to Industrial Scale. **Food Engineering Reviews**, v. 9, n. 3, p. 143–169, 1 set. 2017.
- MINETO, A. R. et al. Development by Design of Experiment and validation of a HPLC-UV method for simultaneous quantification of 1-nitro-2-phenylethane and methyleugenol: Application to nail permeation/retention studies. **Submetido para**

publicação no periódico **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, 2023.

MIRON, D. et al. Influence of penetration enhancers and molecular weight in antifungals permeation through bovine hoof membranes and prediction of efficacy in human nails. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 51, n. 1, p. 20–25, 2014.

MISHRA, V. et al. Solid lipid nanoparticles: Emerging colloidal nano drug delivery systems. **Pharmaceutics**, v. 10, n. 4, p. 2–21, 1 dez. 2018.

MONTI, D. et al. In Vitro Transungual Permeation of Ciclopirox from a Hydroxypropyl Chitosan-Based, Water-Soluble Nail Lacquer. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, v. 31, n. 1, p. 11–17, 1 jan. 2005.

MYOUNG, Y.; CHOI, H. K. Permeation of ciclopirox across porcine hoof membrane: Effect of pressure sensitive adhesives and vehicles. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 20, n. 3, p. 319–325, 2003.

NATIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION. **PubChem Compound Database; CID = 80208, (2023)**.

NATIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION. **PubChem Compound Database; CID = 7127, (2023)**.

NGUYEN, H. X.; BANGA, A. K. Effect of ablative laser on in vitro transungual delivery. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 544, n. 2, p. 402–414, 15 jun. 2018.

OGER, J. M. et al. Aniba canelilla (H.B.k.) mez essential oil: Analysis of chemical constituents, fungistatic properties. **Journal of Essential Oil Research**, v. 6, n. 5, p. 493–497, 1994.

PATEL, D. K. et al. Nanostructured lipid carrier (NLC) a modern approach for topical delivery: a review. **World Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**, v. 2, n. 3, p. 921–938, 2013.

PATEL, K. Y. et al. QbD approach to HPLC method development and validation of ceftriaxone sodium. **Future Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 7, n. 1, dez. 2021.

PENG, H. et al. A pH-responsive nano-carrier with mesoporous silica nanoparticles cores and poly(acrylic acid) shell-layers: Fabrication, characterization and properties for controlled release of salidroside. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 446, n. 1–2, p. 153–159, 25 mar. 2013.

PERAMAN, R.; BHADRAYA, K.; PADMANABHA REDDY, Y. Analytical quality by design: A tool for regulatory flexibility and robust analytics. **International Journal of Analytical Chemistry**, v. 2015, 2015.

PHILLIPS, D. J. et al. Overcoming sink limitations in dissolution testing: A review of traditional methods and the potential utility of biphasic systems. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 64, n. 11, p. 1549–1559, nov. 2012.



- POLITIS, S. N. et al. Design of experiments (DoE) in pharmaceutical development. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, v. 43, n. 6, p. 889–901, 3 jun. 2017.
- QUATRIN, P. M. et al. Ex vivo nail infection as an effective preclinical method for screening of new topical antifungals. **Journal de Mycologie Medicale**, v. 30, n. 2, p. 100938, 1 jun. 2020.
- RAWLINGS, A. V.; LOMBARD, K. J. **A review on the extensive skin benefits of mineral oil.** **International Journal of Cosmetic Science**, dez. 2012.
- ROCHA, K. A. D. et al. Voriconazole-loaded nanostructured lipid carriers (NLC) for drug delivery in deeper regions of the nail plate. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 531, n. 1, p. 292–298, 5 out. 2017.
- SANER, M. V.; KULKARNI, A. D.; PARDESHI, C. V. Insights into drug delivery across the nail plate barrier. **Journal of Drug Targeting**, v. 22, n. 9, p. 769–789, 1 nov. 2014.
- SCHULTZ, S. et al. High-pressure homogenization as a process for emulsion formation. **Chemical Engineering and Technology**, v. 27, n. 4, p. 361–368, abr. 2004.
- SHARMA, A.; BALDI, A. Nanostructured Lipid Carriers: A Review. **Journal of Developing Drugs**, v. 7, n. 1, p. 1–12, 2018.
- SHETH, N. S.; MISTRY, R. B. Formulation and evaluation of transdermal patches and to study permeation enhancement effect of eugenol. **Journal of Applied Pharmaceutical Science**, v. 1, n. 3, p. 96–101, 2011.
- SHIVAKUMAR, H. N. et al. Ungual and Transungual drug delivery. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, v. 38, n. 8, p. 901–911, ago. 2012.
- SILVA, N. N. S. et al. Acetylcholinesterase inhibitory activity and molecular docking study of 1-nitro-2-phenylethane, the main constituent of Aniba canelilla essential oil. **Chemical Biology and Drug Design**, v. 84, n. 2, p. 192–198, 2014.
- SOUZA, D. P. et al. Fungicidal properties and insights on the mechanisms of the action of volatile oils from Amazonian Aniba trees. **Industrial Crops and Products**, v. 143, p. 111914, 1 jan. 2020.
- SOUZA-JUNIOR, F. J. C. et al. Aniba canelilla (Kunth) Mez (Lauraceae): A Review of Ethnobotany, Phytochemical, Antioxidant, Anti-Inflammatory, Cardiovascular, and Neurological Properties. **Frontiers in Pharmacology**, v. 11, p. 699, 26 maio 2020.
- TAMJIDI, F. et al. Nanostructured lipid carriers (NLC): A potential delivery system for bioactive food molecules. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v. 19, p. 29–43, jul. 2013.
- TAMPUCCI, S. et al. Formulations Based on Natural Ingredients for the Treatment of Nail Diseases. **Current Pharmaceutical Design**, v. 26, n. 5, p. 556–565, 23 jan. 2020.

- TAPEINOS, C.; BATTAGLINI, M.; CIOFANI, G. Advances in the design of solid lipid nanoparticles and nanostructured lipid carriers for targeting brain diseases. **Journal of Controlled Release**, v. 264, p. 306–332, 28 out. 2017.
- TAVEIRA, F. S. N. et al. Seasonal essential oil variation of *Aniba canelilla*. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 31, p. 69–75, 2003.
- TAVERNIERS, I.; DE LOOSE, M.; VAN BOCKSTAELE, E. Trends in quality in the analytical laboratory. II. Analytical method validation and quality assurance. **TrAC - Trends in Analytical Chemistry**, v. 23, n. 8, p. 535–552, 2004.
- THATAI, P.; SAPRA, B. Transungual delivery: Deliberations and creeds. **International Journal of Cosmetic Science**, v. 36, n. 5, p. 398–411, 2014.
- THATAI, P.; SAPRA, B. Structural and component mining of nails using bioengineering techniques. **International Journal of Cosmetic Science**, v. 39, n. 3, p. 225–240, 1 jun. 2017.
- THATAI, P.; SAPRA, B. Terbinafine hydrochloride nail lacquer for the management of onychomycosis: Formulation, characterization and in vitro evaluation. **Therapeutic Delivery**, v. 9, n. 2, p. 99–118, 1 fev. 2018.
- THATAI, P.; TIWARY, A. K.; SAPRA, B. Progressive development in experimental models of transungual drug delivery of anti-fungal agents. **International Journal of Cosmetic Science**, v. 38, n. 1, p. 1–12, 1 fev. 2016.
- TOSTI, A.; ELEWSKI, B. E. Onychomycosis: Practical Approaches to Minimize Relapse and Recurrence. **Skin Appendage Disorders**, v. 2, n. 1–2, p. 83–87, 2016.
- URMI, K. F.; NAWAZ, MD. S.; ISLAM, S. M. A. Analytical quality by design approach to RP-HPLC method development and validation for simultaneous estimation of esomeprazole and naproxen in modified-release dosage form. **Future Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 8, n. 1, dez. 2022.
- VERCH, T. et al. Analytical Quality by Design, Life Cycle Management, and Method Control. **AAPS Journal**, v. 24, n. 1, 1 fev. 2022.
- VITORINO, C. et al. QbD-driven development of intranasal lipid nanoparticles for depression treatment. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 153, p. 106–120, 1 ago. 2020.
- WALTERS, K. A.; ABDALGHAFOR, H. M.; LANE, M. E. The human nail - Barrier characterisation and permeation enhancement. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 435, n. 1, p. 10–21, 1 out. 2012.
- ZOU, K. H.; TUNCALI, K.; SILVERMAN, S. G. Correlation and simple linear regression. **Radiology**, v. 227, n. 3, p. 617–622, 1 jun. 2003.

**ANEXO – Pedido de patente de invenção depositado no Instituto Nacional da Propriedade Industrial (INPI)**

O texto deste anexo, que na versão completa da dissertação defendida ocupa o intervalo de páginas compreendido entre 146 – 185, foi suprimido por tratar-se de manuscrito de pedido de patente de invenção intitulado “Composição de carreador lipídico nanoestruturado contendo 1-nitro-2-feniletano, processo de obtenção e uso para tratamento de dermatofitoses”, depositado no Instituto Nacional da Propriedade Industrial (INPI) sob número de processo BR1020220247790, conforme referência abaixo.

KOESTER, L. S. et al. **Composição de carreador lipídico nanoestruturado contendo 1-nitro-2-feniletano, processo de obtenção e uso para o tratamento de dermatofitoses**. Depositante: Universidade Federal do Rio Grande do Sul; Fundação Universidade do Amazonas. BR1020220247790. Depósito: 2 dez. 2022.

























































































