



Pontifícia Universidade Católica de São Paulo
Faculdade de Ciências Médicas e da Saúde
FCMS – PUC/SP



Thais Viço Destro

Desenvolvimento de um hidrogel à base de celulose e quitosana contendo Óleo Essencial de Melaleuca no tratamento de onicomicose causada por *dermatófito* e *levedura*.

Mestrado em Biomateriais e Medicina Regenerativa

Sorocaba
2025

Thais Viço Destro

Desenvolvimento de um hidrogel à base de celulose e quitosana contendo Óleo Essencial de Melaleuca no tratamento de onicomicose causada por *dermatófito* e *levedura*.

Dissertação de Mestrado apresentada à Banca Examinadora da Pontifícia Universidade Católica de São Paulo, como exigência parcial para obtenção do título de Mestre em **Biomateriais e Medicina Regenerativa**. Orientadora: Profa. Dra. **Priscila Randazzo de Moura**.

Sorocaba

2025

Sistemas de Bibliotecas da Pontifícia Universidade Católica de São Paulo -
Ficha Catalográfica com dados fornecidos pelo autor

V638d Destro, Thais Viço
Desenvolvimento de um hidrogel à base de celulose e quitosana contendo óleo essencial de melaleuca no tratamento de onicomicose causada por dermatófito e levedura.. / Thais Viço Destro. -- Sorocaba, SP: [s.n.], 2025.
74p. il. ; cm.

Orientador: Priscila Randazzo Moura.
Dissertação (Mestrado)-- Pontifícia Universidade Católica de São Paulo, Programa de Estudos Pós-Graduados em Biomateriais e Medicina Regenerativa.

1. Óleo essencial de melaleuca. 2. Onicomicose. 3. Biomateriais. 4. Sistema de liberação modificado. I. Moura, Priscila Randazzo. II. Pontifícia Universidade Católica de Sorocaba, SP, Programa de Estudos Pós-Graduados em Biomateriais e Medicina Regenerativa. III. Título.

CDD

Banca Examinadora

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de
Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior- Brasil (CAPES) – Código de
Financiamento 001 – processo número 88887.903576/2023-00

AGRADECIMENTOS

À Deus, pela sabedoria e fé para acreditar que tudo é possível.

À PUC pela oportunidade de fazer o curso e à CAPES por ceder a bolsa de ensino.

À minha orientadora Prof. Dra. Priscila Randazzo de Moura, por me receber como aluna de mestrado. Pela confiança no meu trabalho, por me ensinar, pelas correções, incentivo e apoio na elaboração deste trabalho. Grande admiração.

Ao meu co-orientador Prof. Dr. Daniel Komatsu, pelo conhecimento compartilhado e por todo apoio nas práticas laboratoriais. Grande admiração.

À todos os meus professores que me acompanharam ao longo do curso e que com empenho, se dedicam à arte de ensinar.

Aos meus pais, pelo amor e incentivo ao ensino.

Ao meu marido pelo apoio e filha pelo amor e compreensão nas minhas ausências.

RESUMO

DESTRO, Thais Viço Desenvolvimento de um hidrogel formador de filme à base de celulose e quitosana com Óleo Essencial de Melaleuca no tratamento de onicomicose causada por dermatófito e levedura.

A onicomicose é uma infecção causada por fungos dermatofíticos e leveduras que afeta 20% da população mundial e constitui 50% de todas as doenças das unhas. Atualmente, as terapias alternativas no tratamento da onicomicose sob investigação, incluem o uso de óleos essenciais, como possíveis agentes antifúngicos. Objetivo: desenvolver um hidrogel formador de filme com a combinação de hidroxipropilmetilcelulose (HPMC) e quitosana associado ao óleo essencial de Melaleuca (OEM) nas concentrações de 1, 2 e 5% para o tratamento de onicomicose. Metodologia: para a caracterização do material foram realizadas as seguintes análises: espectroscopia do infravermelho por transformada De Fourier (FTIR), termogravimetria (TG) e calorimetria exploratória diferencial (DSC); para as análises microbiológicas foram realizados: teste de sensibilidade com a determinação do halo de inibição e comparativo com padrão de antifúngicos (antifungigrama), além do ensaio de determinação da inibição do crescimento microbiano por análise da densidade óptica, que avalia o crescimento microbiano em meio líquido pela leitura da turbidez. Resultados: A análise de FTIR mostrou que não houve interação química entre os componentes, sendo isto importante para garantir a liberação do OEM para fins de tratamento. A análise de DSC mostrou que o aumento da concentração do OEM causou uma diminuição na interação entre o OEM e os componentes do hidrogel (HPMC e quitosana), facilitando a vaporização do OEM. Já a análise de TG mostrou que a concentração de OEM não influenciou a propriedade térmica das amostras. Na análise microbiológica, as concentrações de 2 e 5% de OEM apresentaram atividades antifúngicas sendo mais notável para levedura. Conclusão: Considerando esses achados, formulações magistrais à base de celulose e quitosana com óleo essencial de melaleuca para formação de filmes ungueais são ferramentas potenciais no tratamento de onicomicoses por dermatófito ou levedura. Além de ser uma alternativa terapêutica natural, de baixo custo e baixa toxicidade. Ensaios clínico futuros são crucialmente importantes para comprovar a segurança e a eficácia.

Palavras-chave: biomaterial, onicomicose, polímero, quitosana, óleos essenciais, melaleuca.

ABSTRACT

Destro T.V. Development of a Film-Forming Hydrogel Based on Cellulose and Chitosan with Tea Tree Essential Oil for the Treatment of Onychomycosis Caused by Dermatophytes and Yeasts.

Onychomycosis is an infection caused by dermatophytic fungi and yeasts that affects 20% of the global population and accounts for 50% of all nail diseases. Currently, alternative therapies under investigation for the treatment of onychomycosis include the use of essential oils as potential antifungal agents. Objective: To develop a film-forming hydrogel combining hydroxypropyl methylcellulose (HPMC) and chitosan, associated with Tea Tree Essential Oil (TTO) at concentrations of 1%, 2%, and 5%, for the treatment of onychomycosis. Methodology: For material characterization, the following analyses were performed: Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FTIR), Thermogravimetric Analysis (TG), and Differential Scanning Calorimetry (DSC). For microbiological analyses, sensitivity testing was conducted by determining the inhibition zone and comparing it to standard antifungal agents (antifungigram), along with microbial growth inhibition analysis through optical density measurement, which assesses microbial growth in liquid medium by turbidity reading. Results: FTIR analysis showed no chemical interaction between the components, which is important to ensure the release of TTO for therapeutic purposes. DSC analysis indicated that increasing the TTO concentration reduced the interaction between TTO and the hydrogel components (HPMC and chitosan), facilitating the evaporation of TTO. TG analysis revealed that TTO concentration did not affect the thermal properties of the samples. In the microbiological analysis, the 2% and 5% TTO concentrations exhibited antifungal activity, which was more pronounced against yeasts. Conclusion: Considering these findings, compounded formulations based on cellulose and chitosan with Tea Tree Essential Oil for nail film formation are potential tools in the treatment of onychomycosis caused by dermatophytes or yeasts. In addition to being a natural, low-cost, and low-toxicity therapeutic alternative, future clinical trials are crucially important to confirm safety and efficacy.

Keywords: biomaterial, onychomycosis, polymer, chitosan, essential oils, melaleuca.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Apresentação esquemática da unha.....	16
Figura 2- Classificação das onicomicoses.....	18
Figura 3- Mecanismo de penetração do fármaco por meio de esmalte.....	21
Figura 4- Processo de obtenção do hidrogel e formação do filme polimérico	26
Figura 5- Embalagem dispensadora do hidrogel para aplicação na lâmina ungueal	27
Figura 6- Espectros de FTIR das amostras individualizadas.....	32
Figura 7- Espectros de FTIR dos filmes com diferentes concentrações de OEM	33
Figura 8- Curva de DSC do hidrogel sem e com quitosana	34
Figura 9- Curva de DSC das amostras: hidrogel com quitosana..... 5% OEM	36
Figura 10- Curva de DSC dos filmes com 1%, 2% e 5% OEM.....	37
Figura 11- Curvas termogravimétricas do hidrogel sem e com quitosana.....	38
Figura 12- Curvas termogravimétricas das amostras:..... ou 5% OEM.....	39
Figura 13- Curvas termogravimétricas dos filmes com 1, 2 e 5% OEM	40
Figura 14- Atividade antifúngica contra C. albicans e T. rubrum	Quitosana.....42
Figura 15- Atividade antifúngica contra C. albicans e T. rubrum.. OEM (1, 2 e 5%)	.44
Figura 16- Antifungigrama e Hidrogel com OEM (1, 2 e 5%).... Mycosel (C e D)	49
Figura 17- Teste de Turbidez: Caldo Sabouraud cultivado....+ OEM 1%, 2 % e 5%	50
Figura 18- Teste de Turbidez: Caldo Sabouraud cultivado.....+ Antifungigrama ..	51

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Esmaltes para onicomicose, disponíveis comercialmente	19
Tabela 2-Valores de entalpia e temperatura de peak (pico).....	34
Tabela 3- Valores de entalpia e temperatura de pico	37
Tabela 4- Valores de entalpia e temperatura de pico	38
Tabela 5- Valores de Tonset, Tendset e Tpeak..... sem e com quitosana.....	39
Tabela 6- Valores de Tonset, Tendset e Tpeak do hidrogelou 5% OEM	40
Tabela 7- Filmes com 1,2 e 5% de OEM.....	41
Tabela 8- Atividade antifúngica contra C. albicanse 5%)	43
Tabela 9- Antifungigrama e Hidrogel com..... e ágar Mycosel (C e D).....	47

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	12
2 REFERENCIAL TEÓRICO.....	16
2.1 Unhas – definição, estrutura, composição e afecções	16
2.2 Onicomicose.....	17
2.3 Agentes Antifúngicos	19
2.4 Óleo Essencial de Melaleuca (OEM)	20
2.5 Administração transungueal de medicamentos.....	21
2.6 Sistema de liberação modificado – Hidrogel	21
3. OBJETIVOS.....	24
3.1. Geral	24
3.2. Específicos	24
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	25
4.1. Biomaterial, Bioativos e Reagentes.....	25
4.2. Obtenção, desenvolvimento e caracterização do Hidrogel	25
4.2.1 Obtenção e desenvolvimento	25
4.3 Caracterização do Hidrogel	27
4.3.1 Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC)	28
4.3.2 Termogravimetria (TG)	28
4.3.3 Espectroscopia no Infravermelho por Transformada De Fourier (FTIR).....	28
4.4 Atividade Antifúngica.....	28
4.4.1 Microorganismos	28
4.4.2. Determinação da Atividade Antifúngica.....	29
4.4.2.1. Teste de sensibilidade.....	29
4.4.2.2. Teste de turbidez.....	30
4.5 Análise Estatística.....	30
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	31
5.1 Caracterização do hidrogel	31
5.2 Atividade antifúngica	41
6 CONCLUSÃO	52
REFERÊNCIAS.....	53
ANEXO A – Certificado De Analise Oleo Essencial Melaleuca.....	60
ANEXO B – LISTA DE ALERGÊNICO	61

ANEXO C – CERTIFICADO ANÁLISE HIDROXIPROPILMETILCELULOSE.....	62
ANEXO D – CERTIFICADO DE ANÁLISE POLIETILENOGLICOL.....	63
ANEXO E – CERTIFICADO DE ANÁLISE PROPILENOGLICOL.....	64
ANEXO F – CERTIFICADO DE ANÁLISE ALCOOL ISOPROPILICO	65
ANEXO G – SENSIFUNGIDISC – DISCOS DE SENSIBILIDADE FÚNGICA PARA ANTIFUNGIGRAMA	66
ANEXO H– ESCALA NEFOLOMÉTRICA DE MC FARLAND	68

1 INTRODUÇÃO

As infecções fúngicas representam um relevante problema de saúde pública global, com crescente prevalência e impacto significativo tanto na qualidade de vida dos pacientes quanto nos sistemas de saúde (Araujo *et al.*, 2023). Dentre essas infecções, a onicomicose se destaca como a mais comum afecção das unhas, responsável por aproximadamente 50% das alterações ungueais (Leung *et al.*, 2020).

Cerca de 5 a 10% da população mundial é acometida por alguma manifestação clínica relacionada à onicomicose, apesar de ser uma condição subnotificada (Lipner; Scher, 2019).

Estudos relatam a prevalência da onicomicose em diversas regiões do mundo, como 14 a 23% na Europa (Lipner *et al.*, 2021), 20% a 36,6% no Leste Asiático (Song *et al.*, 2022) e 14% na América do Norte e na América do Sul (Lipner; Scher, 2019).

A onicomicose impõe um impacto significativo na qualidade de vida dos pacientes, gerando dor, dificuldades na mobilidade e implicações sociais (Falotico; Lipner, 2022). Trata-se de infecção crônica da lâmina ungueal causada, principalmente, por fungos dermatófitos como *Trichophyton rubrum* e *Trichophyton mentagrophytes*, além de leveduras do gênero *Cândida* e fungos filamentosos não dermatofíticos (Santos *et al.*, 2022).

Quanto ao local de infecção, as unhas dos pés são mais acometidas em relação às das mãos (Leung *et al.*, 2020). O aspecto clínico das lesões depende do agente etiológico e do estado imunológico do paciente. São observados espessamento das unhas, descoloração e separação do leito ungueal, onicólise e lesões na pele da região periungueal (Gupta *et al.*, 2021).

Para o tratamento, a conduta inicial, deve ser um diagnóstico preciso do agente causal, sendo primordial para definir o tratamento adequado e obter êxito (Leung *et al.*, 2020).

O tratamento apresenta desafios consideráveis, decorrentes de fatores como a penetração profunda do fungo na lâmina ungueal, a exigência de tratamentos prolongados, a baixa adesão por parte dos pacientes e a recorrência frequente do quadro. As opções terapêuticas abrangem a terapia antifúngica oral, terapia tópica, laser, fotodinâmica e, em casos de unhas cronicamente espessas, a avulsão cirúrgica, apesar de não haver comprovação de sua utilidade (Leung *et al.*, 2020).

As plantas são usadas de forma terapêutica há tempos em todo mundo. Os óleos essenciais são obtidos a partir de partes das plantas e possuem como principais componentes os mono e sesquiterpenos (Natu; Tatke, 2019). Os compostos fenólicos presentes nos óleos essenciais têm sua atividade reconhecida como importantes bioativos antimicrobianos (Khwaza; Aderibigbe, 2025).

Diversos óleos essenciais são utilizados com finalidade antimicrobiana, dentre eles se destaca o óleo essencial de melaleuca comumente usada por possuir atividade antifúngica sinérgica com os derivados azólicos ungueais (Vörös-Horváth, 2020).

Na busca por novos tratamentos eficazes e naturais contra onicomicose, o óleo essencial de melaleuca (OEM) provou ser uma solução promissora. Ele tem propriedades antimicrobianas comprovadas e seu uso é apoiado por crescentes evidências científicas (Villar Rodríguez *et al.*, 2022). Outra razão para o uso frequente deste OE é sua eficácia contra uma ampla gama de microrganismos, incluindo aqueles que causam onicomicose, como *Trichophyton rubrum* e *Candida albicans* (Winkelman, 2018). Uma das principais razões para sua atividade antifúngica é a presença de alta concentração de terpinen-4-ol (D'Agostino *et al.*, 2019). Este composto, juntamente com o alfa-terpineol e o eucaliptol (também conhecido como 1,8-cineol), é conhecido por aumentar a permeabilidade da membrana celular dos fungos e alterar a morfologia micelial e a ultraestrutura celular (Yu *et al.*, 2015).

O manejo das onicomicoses normalmente é longo, torna-se oneroso ao paciente e dura em média 10-12 meses. Esses fatores muitas vezes levam à falta de adesão, o que gera insucesso no tratamento (Khosravi; Shokri; Saffarian, 2020). Outro fator que influencia a baixa adesão ao tratamento é que, embora a terapia oral se mostre eficaz, em caso de uso por tempo prolongado pode causar efeitos colaterais e interações medicamentosas (Marcos-Tejedor; González-García; Mayordomo, 2020). Desta forma, a busca por novas alternativas de tratamento para onicomicose tem sido bastante promissora.

O tratamento convencional tópico apresenta desafios significativos, seja pela baixa eficácia das formulações — devido à limitada permeação através da lâmina ungueal —, seja pelos efeitos adversos associados às terapias sistêmicas (Mauch, 2020).

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).

Desta forma, 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).

Nesse contexto, o desenvolvimento de um hidrogel formador de filme ungueal capaz de superar as barreiras estruturais da lâmina ungueal, torna-se essencial e oferece vantagens como adesão à superfície ungueal, formação de barreira física e liberação do princípio ativo (Mineto, 2023).

A associação de biopolímeros como a hidroxipropilmetilcelulose (HPMC) e a quitosana permite a elaboração de matrizes poliméricas com excelentes propriedades físico-químicas e biológicas. O HPMC destaca-se pela capacidade de formar filmes flexíveis, resistentes e transparentes, além de ser biocompatível e de fácil processamento (Barros; Lima; Bunhak, 2022). Por sua vez, a quitosana, um polissacarídeo natural derivado da quitina, apresenta características particularmente vantajosas no contexto de sistemas de liberação tópica (Rajinikanth *et al.*, 2024).

A quitosana é um polímero catiônico, devido à presença de grupos amina protonáveis em sua estrutura, que lhe conferem carga positiva em pH fisiológico (Abd Rashed *et al.*, 2021). A lâmina ungueal, composta predominantemente por queratina, apresenta carga superficial negativa devido aos grupos carboxila e sulfidril presentes na matriz proteica (Murdan, 2002). Este fato favorece interações eletrostáticas com polímeros catiônicos como a quitosana, promovendo bioadesão, aumento do tempo de residência e, conseqüentemente, maior eficácia terapêutica.

Adicionalmente, a quitosana possui propriedades intrínsecas de atividade antimicrobiana e antifúngica, biocompatibilidade, biodegradabilidade e capacidade de promover hidratação controlada, características que a tornam um polímero estratégico no desenvolvimento de sistemas tópicos inteligentes.

A incorporação do óleo essencial de *Melaleuca alternifolia*, conhecido por sua atividade antifúngica contra dermatófitos e leveduras, complementa a proposta. Este ativo natural oferece uma abordagem terapêutica eficaz, segura e menos propensa ao desenvolvimento de resistência fúngica, embora sua elevada volatilidade e sensibilidade demandem estratégias de encapsulamento e proteção (Carson; Hammer; Riley, 2006).

Diante desse cenário, o presente trabalho propõe o desenvolvimento e a caracterização de um hidrogel formador de filme à base do HPMC e quitosana, associado ao óleo essencial de *Melaleuca alternifolia*, como uma alternativa eficiente para o tratamento da onicomicose causada por fungos *dermatófitos* e *leveduras* (Hammer; Carson; Riley, 2004; Lipner; Scher, 2019). Este sistema visa superar as limitações das terapias atuais, promovendo maior adesão à lâmina ungueal e eficácia antifúngica.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

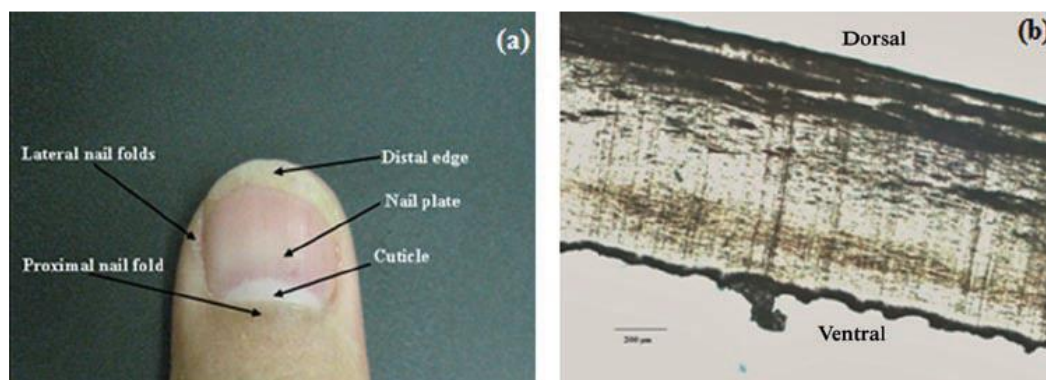
2.1 Unhas – definição, estrutura, composição e afecções

A unha (ou *úngüis*; *úngües* no plural) do dedo humano foi apresentado na figura 1. É um anexo cutâneo que se superpõe à face dorsal das falanges distais. As unhas protegem as sensíveis extremidades digitais, prestam-se à função de arranhar, crescendo cerca de 2 a 4,5mm por mês (Lopes *et al.*, 1999).

A lâmina ungueal humana é uma barreira resistente à penetração de compostos grandes e lipofílicos, incluindo agentes antifúngicos comumente usados no tratamento de doenças das unhas (Murdan, 2010).

A placa ungueal humana consiste em 80% de proteína (principalmente α -queratinas), 10- 30% de água, 0,1-1% de lipídios e traços de minerais e eletrólitos (Dhamoon; Popli; Gupta, 2019). Assim, íons e medicamentos (por exemplo, itraconazol) são incorporados às unhas por mecanismos da matriz ungueal e do leito ungueal (Rajendra *et al.*, 2012). A lâmina ungueal é carregada negativamente no pH fisiológico de 7,4 (Smith; Hao; Li, 2010).

Figura 1- Apresentação esquemática da unha



a) Unha do dedo humano. b) Seção microscópica mostrando diferentes camadas da placa ungueal humana.

Fonte: Shivakumar *et al.* (2012).

Diante da relevância clínica, social e terapêutica dessa infecção, torna-se fundamental compreender os aspectos que envolvem a onicomicose, seus agentes etiológicos, manifestações clínicas, bem como os desafios associados ao desenvolvimento de terapias mais eficazes e seguras, tema que será explorado no tópico a seguir.

2.2 Onicomicose

A onicomicose é uma infecção causada por fungos dermatofíticos e não-dermatofíticos e leveduras que afeta 20% da população mundial e constitui 50% de todas as doenças das unhas (Nogueiras-Nieto; Delgado-Charro; Otero-Spinar, 2013).

As onicomicoses estão em destaque nas onicopatias de regiões tropicais, principalmente devido ao clima quente e úmido. Fazem parte de sua origem três grupos de fungos bem definidos: os dermatófitos, em 80 a 90%, dos gêneros *Trichophyton* e *Epidermophyton*; raramente o gênero *Microsporum*, seguidos pelas leveduras, em cinco a 7%, sendo a *Candida albicans* o organismo mais comum, e os fungos não dermatófitos em dois a 12% (Araujo *et al.*, 2003; Lacaz *et al.*, 2002).

A classificação das onicomicoses foi baseada nos quatro tipos clínicos específicos de alterações ungueais (Jinna; Finch, 2015), conforme figura 2.

a) Onicomicose subungueal distal e lateral (OSDL): variedade clínica mais frequente (90%); a invasão começa no hiponíqueo (unha livre) e na borda distal e lateral da lâmina ungueal, estendendo-se de forma lenta e progressiva até o setor proximal da unha (Gupta; Studholme, 2016).

b) Onicomicose branca superficial (OBS): representa dois a 5% das onicomicoses dermatofíticas. Caracteriza-se pela penetração *in situ* de estruturas fúngicas em direção ao interior da lâmina ungueal, podendo ser facilitada por traumas anteriores. É mais comumente observada nas unhas dos pés (Lopes *et al.*, 1999).

c) Onicomicose subungueal proximal (OSP): é a variante clínica menos comum, sendo observada com maior frequência em indivíduos com síndrome da imunodeficiência adquirida. Inicia-se pela invasão do fungo no estrato córneo da dobra ungueal proximal e subsequentemente, na lâmina ungueal (Dhamoon; Popli; Gupta, 2019).

d) Onicodistrofia total (OT): é o estágio final das onicomicoses por dermatófitos, não dermatófitos ou *Candida* sp. Verifica-se acometimento da matriz ungueal, e a totalidade da unha está alterada (Dhamoon; Popli; Gupta, 2019).

Figura 2- Classificação das onicomicoses



a) Onicomicose Subungueal e distal



b) Onicomicose branca



c) Onicomicose subungueal proximal



d) Onicomicose distrófica total

Fonte: Dhamoon, Popli e Gupta (2019).

O diagnóstico laboratorial das onicomicoses pode ser realizado pelo exame micológico direto (EMD), por cultura fúngica e, exame histopatológico através da biópsia ungueal, ou do procedimento clipping ungueal (unha é cortada na sua porção distal e livre, e o fragmento resultante é processado e corado com ácido periódico de Schiff com digestão, em que as hifas são vistas dispostas entre as camadas da unha, paralelas à superfície (Gupta; Studholme, 2016).

A cultura é necessária para o isolamento e identificação da espécie, devendo o material ser inoculado sempre em diferentes meios, por exemplo, o ágar Sabouraud simples, o ágar Sabouraud com cicloheximida, que inibe o crescimento de fungos contaminantes, o ágar Sabouraud com cloranfenicol, que tem por finalidade inibir o crescimento de bactérias, o ágar batata, utilizado na manutenção de culturas de dermatófitos, o ágar-fubá e o ágar-arroz, utilizados na indução de clamidósporo terminal de *Candida albicans*, o ágar-lacrimel, que é meio bastante enriquecido, permitindo o crescimento de fungos filamentosos e leveduras em geral (Dhamoon; Popli; Gupta, 2019).

O tratamento da onicomicose apresenta desafios significativos, uma vez que a estrutura queratinizada da unha dificulta a penetração dos agentes antifúngicos, o que, somado à lenta taxa de crescimento ungueal, prolonga o tempo de tratamento e contribui para altas taxas de recidiva (Lacaz *et al.*, 2002). Apesar das opções disponíveis, o tratamento da onicomicose ainda é considerado longo, oneroso e,

frequentemente, ineficaz em termos de erradicação completa, especialmente em populações de risco. Diante disso, o desenvolvimento de estratégias terapêuticas mais eficazes e seguras, especialmente no campo dos antifúngicos, torna-se uma necessidade constante na busca por soluções que superem as limitações dos tratamentos convencionais (Galhardas Perusinha; Rosado; Lencastre, 2019).

Nesse contexto, o próximo tópico abordará os principais antifúngicos utilizados no manejo da onicomicose, suas características farmacológicas, mecanismos de ação e limitações clínicas.

2.3 Agentes Antifúngicos

A terapêutica clássica inclui fármacos sistêmicos administrados por via oral – terbinafina, da classe alilamina, itraconazol e fluconazol, da subclasse triazol –1 e fármacos tópicos disponíveis sob a forma de esmalte – amorolfina, da classe morfolina, e ciclopirox, da classe hidroxipiridinona (Nogueiras-Nieto; Delgado-Charro; Otero-Spinar, 2013), conforme tabela 1. A maioria atua em diferentes etapas da via de biossíntese do ergosterol, um componente responsável pela permeabilidade e fluidez da membrana celular do fungo, o que implica variações na atividade antifúngica (Kaur; Kashyap; Bhalla, 2008).

Tabela 1- Esmaltes para onicomicose, disponíveis comercialmente

Agentes Terapêuticos	Nome Comercial	Fabricante
Ciclopiroxamina 8%	Onlyac	Dermic, Canada
Ciclopiroxamina 8%	Penlac	Roche lab , australia
Ciclopiroxamina 8%	Nailon	Protech Biosystem, India
Amorolfine 5%	Loceryl	Protech Biosystem, India
Econazole 5%	Econail	MacrochenCorporação, Lexington

Fonte: Rajendra *et al.* (2012).

O Tavaborol é a primeira molécula de uma nova classe de fármacos, que contém o elemento químico boro, denominada oxaborol. É comercializada na apresentação de solução tópica à 5% (Rajendra *et al.*, 2012).

2.4 Óleo Essencial de Melaleuca (OEM)

As terapias alternativas atualmente sob investigação incluem o uso de diversos óleos essenciais como possíveis agentes antifúngicos para tratar onicomicoses (Gupta; Paquet; Simpson, 2013; Rajendra *et al.*, 2012).

O óleo da árvore do chá, *Tea Tree* ou óleo essencial de Melaleuca (OEM), conhecido por suas propriedades antibacterianas, antifúngicas e anti-inflamatórias, é um óleo essencial obtido das folhas da *Melaleuca alternifolia*. Sua composição é baseada em uma mistura complexa de compostos, principalmente hidrocarbonetos, sesquiterpenos e monoterpênicos, bem como seus álcoois associados (Flores *et al.*, 2013).

A composição do OEM contém aproximadamente 100 componentes químicos (Murdan, 2002). Sendo os principais, o terpinen-4-ol, gama-terpreno, α -terpreno, 1,8 cineol e α -pineno e é um óleo parcialmente solúvel em água. Para se obter solução aquosa do óleo, é necessário adicionar agentes emulsificantes, os quais não alteram as propriedades antimicrobianas (Williams, 1990).

De acordo com o Comitê Australiano, para que o OEM possua atividade antisséptica, ele deve conter quantidade de cineol abaixo de 15% e de terpinen-4-ol acima de 30%, conforme ISO 4730/2004 (International Organisation for Standardisation, 2004).

O Terpinen-4-ol está presente em 30-40% da composição, sendo o componente que detém a principal atividade antimicrobiana, pois induz perda da membrana, interferindo na integridade e fisiologia bacteriana (Carson; Hammer; Riley, 2006).

A concentração inibitória mínima (CIM, ou seja, a menor concentração do agente antimicrobiano capaz de inibir o desenvolvimento do microrganismo) do óleo de melaleuca, contra os agentes patógenos mais comuns encontra-se entre 0,5 a 1% (Simões; Spitzer, 2004). Porém, a concentração pode variar entre 0,5 a 5% em cosméticos e entre 5 a 10% em formulações farmacêuticas (Garcia, 2003).

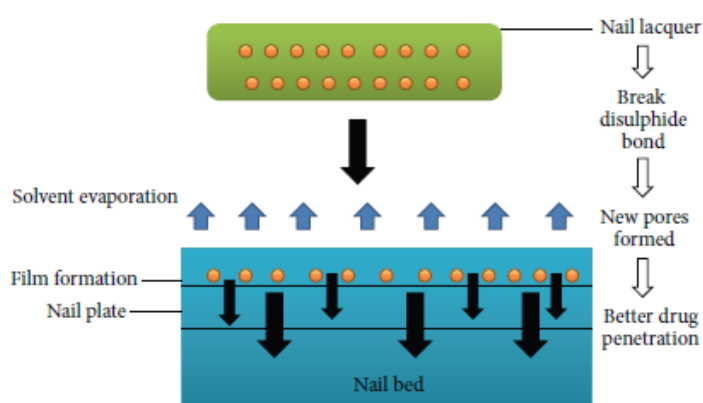
O OEM possui amplo espectro de ação antibacteriana, possuindo efeito bactericida *in natura* e bacteriostático em baixas concentrações (Kwieciński; Eick; Wójcik, 2009; Traboulsi; Mukherjee; Ghannoum, 2007; Wilkinson; Cavanagh, 2005) antifúngico (Oliva *et al.*, 2003; Traboulsi; Mukherjee; Ghannoum, 2007) e antiviral (Oliva *et al.*, 2003).

2.5 Administração transungueal de medicamentos

Os esmaltes medicinais constituem um tipo inovador de formulações que tem sido usadas para administração transungueal de medicamentos. Essas preparações consistem em uma solução de um polímero formador de filme e um medicamento.

Conforme ilustrado na figura 3, após aplicação sobre a placa ungueal, ocorre a evaporação do solvente. A película formada atua como depósito do medicamento. A partir deste, o medicamento é liberado e penetra na unha por um período de tempo. Um gradiente de difusão é gerado para penetração do medicamento na placa ungueal (Zupanc *et al.*, 2024).

Figura 3- Mecanismo de penetração do fármaco por meio de esmalte



Fonte: Akhtar, Sharma e Pathak (2012)

2.6 Sistema de liberação modificado – Hidrogel

Pesquisas científicas abrangentes destinadas a compreender o mecanismo de ação dos óleos essenciais e seus componentes podem fornecer a base para uma alternativa natural aos antifúngicos tópicos, mitigando os efeitos colaterais clinicamente importantes dos medicamentos antifúngicos alopáticos, como: intoxicações, interações medicamentosas e até hepatotoxicidade. Esta pesquisa poderá contribuir com uma formulação efetiva e ideal, de aplicação tópica, portanto com menos efeitos colaterais e maior eficiência e potência na cura das infecções fúngicas de unhas, que são clinicamente preocupantes por ser tratar de tratamento longo e de difícil êxito (Akhtar; Sharma; Pathak, 2016).

Os antifúngicos no mercado estão listados na forma de cremes, pomadas, vernizes, soluções, loções e pós. Até o momento, as formulações usadas

comercialmente, não são especificamente adequadas para as unhas por causa da remoção indesejada devido a fricção e a lavagem (Gupta; Simpson, 2016). São escassas as pesquisas científicas quanto ao uso de hidrogel formador de filme adesivo com OEM num sistema de liberação modificada de fármaco, o que justifica a originalidade deste trabalho, bem como, exprime relevância clínica.

Os derivados celulósicos são polímeros promissores na elaboração de biomateriais na apresentação de filmes poliméricos devido sua biocompatibilidade, estabilidade, baixa toxicidade, adesividade, liberação modificada de fármacos/ativos e custo baixo (El Fawala *et al.*, 2020).

A quitosana é um polissacarídeo natural policatiônico derivado da quitina, que é encontrada em carapaças de crustáceos e parede celular de fungos. A quitosana possui atividades antimicrobianas: antifúngica e bactericida. Além disso, é biocompatível, biodegradável, bioativa e possui uma excelente capacidade de formar filmes (Martinez-Camacho *et al.*, 2007).

Devido à alta densidade de cargas positivas do polímero, a quitosana atrai e se liga aos lipídeos (carga negativa da unha), contribuindo assim para melhor adesão ungueal (Hao; Smith; Li, 2010).

A hidroxipropilmetilcelulose (HPMC) é um polímero largamente utilizado na indústria farmacêutica, em formas farmacêuticas orais e de uso tópico. É inclusive o polímero hidrófilo mais utilizado no desenvolvimento de sistemas de liberação modificada devido suas características de intumescência e gelificação que permitem modular a liberação de fármacos (Ding; Zhang; Guonying, 2015).

Neste projeto, os polímeros como hidroxipropilmetilcelulose (HPMC) associado a quitosana, foram desenvolvidos para formar um hidrogel e após secagem, filme adesivo seguindo o método de evaporação de solvente. O óleo essencial de melaleuca foi incorporada no hidrogel nas concentrações de 1%, 2% e 5% e posterior análise em culturas com a levedura *Candida albicans* e o fungo dermatófito *Trichophyton rubrum*, afim de definir as concentrações mínimas com propriedades antifúngicas. O filme adesivo foi avaliado quanto à aparência física, FTIR, análises térmicas (DSC e TG), além das análises microbiológicas.

Considerando as limitações inerentes às terapias tópicas e oral, bem como a potencial nocividade dos agentes antifúngicos à saúde humana, o desenvolvimento de uma formulação tópica a partir do hidrogel contendo ativo de origem natural, baixo custo e baixa toxicidade, visa estabelecer, uma nova alternativa terapêutica, eficaz e

mais segura que as comercialmente existentes, no tratamento da onicomicose por levedura e/ou dermatófitos.

3. OBJETIVOS

3.1. Geral

Desenvolver um hidrogel formador de filme com a combinação do HPMC e quitosana associado ao óleo essencial de melaleuca para o tratamento de onicomicose.

3.2. Específicos

- Desenvolver e caracterizar o hidrogel associado ao óleo essencial de melaleuca, que após secagem formará um filme adequado à geometria das lâminas ungueais;
- Determinar a atividade antifúngica do hidrogel, através dos:
 - a) Teste de sensibilidade: determinação do halo de inibição e comparativo com padrão de antifúngicos (antifungigrama), que incluem: Clotrimazol, Fluconazol, Nistatina, Cetoconazol, Itraconazol e Miconazol.
 - b) Teste de turbidez: avaliar a concentração mínima que inibe o crescimento microbiano.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Biomaterial, Bioativos e Reagentes

O óleo essencial de melaleuca (OEM) foi adquirido da marca WNF lote 2459/24, validade 10/08/2025. A quitosana (grau de desacetilação de 86%), massa molar média na faixa de 60 a 300KDA foi adquirida da empresa Polymar Indústria, Comércio, Importação e Exportação Ltda. HPMC (massa molar média 340KDA), polietilenoglicol (400K) e propilenoglicol foram adquiridos do grupo Fagron do Brasil Farmacêutica Ltda. O álcool Isopropílico grau USP 35, com teor de 99,97% foi obtido do laboratório Labsynth. Todos os meios de cultura da marca Probac, as cepas da levedura *C. albicans* provenientes do acervo do Lab. de Microbiologia da FCMS-PUC/SP, a linhagem liofilizada de *T. rubrum* linhagem da Fundação André Tosello do Laboratório, Referência URM 719, lote 15.19. Os discos para antifungigrama, discos de papel (diâmetro 6,35 mm) impregnados com antifúngicos: nistatina (100UI), clotrimazol (50mcg), miconazol (50mcg), cetoconazol (50mcg), fluconazol (25mcg), itraconazol (10mcg), marca Sensifungidisc - Cecon (Centro de Controle e Produtos para Diagnósticos Ltda, validade: ago/2025). Escala nefelométrica de Mc Farland – 11 tubos de Nefelobac numerados de 0,5 – 10 (padrão de turvação), marca Probac.

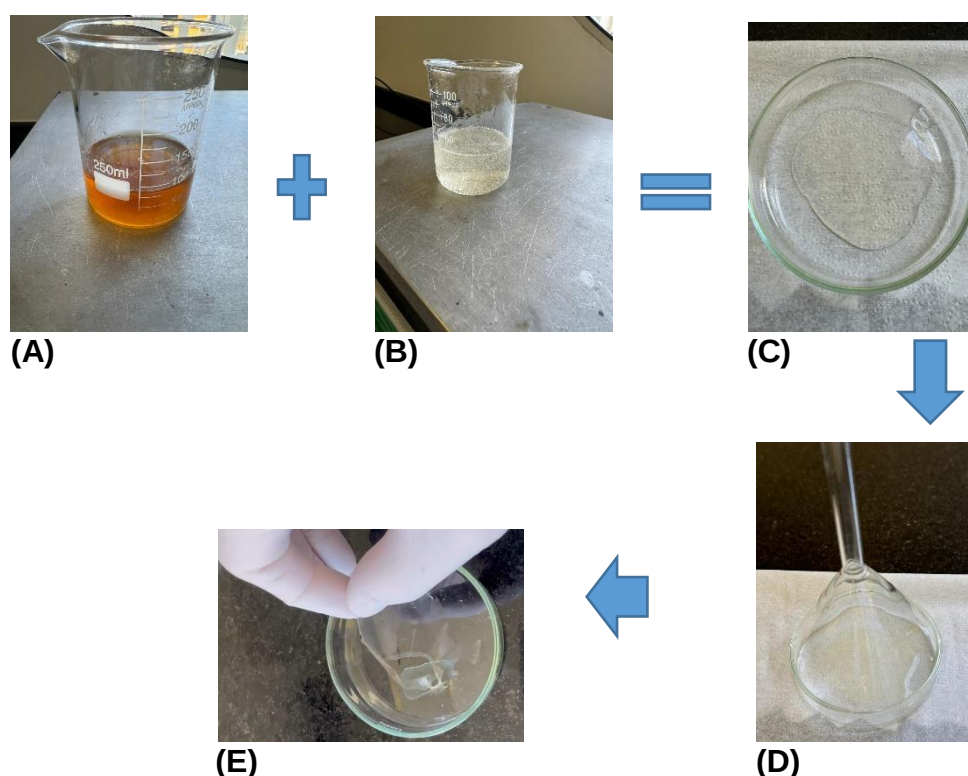
4.2. Obtenção, desenvolvimento e caracterização do Hidrogel

4.2.1 Obtenção e desenvolvimento

De acordo com a Farmacopeia Brasileira 6 edição (Brasil, 2019), o óleo essencial de melaleuca deve conter, no mínimo, 30% de terpinen-4-ol, que é o principal componente ativo responsável pelas propriedades antissépticas e anti-inflamatórias (Wilkinson; Cavanagh, 2005). Embora a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) não defina limites máximos específicos para o uso do óleo essencial de melaleuca em produtos acabados, as literaturas técnica e farmacêutica sugere as seguintes concentrações: 2 a 5% para géis antiacne, 5 a 10% para shampoos e condicionadores para caspa e seborreia e, cremes para micoses até 10%, conforme RDC Nº 298, de 12 de agosto de 2019 (Brasil, 2019). Portanto, como este trabalho se trata do desenvolvimento de um hidrogel, estabeleceu-se a concentração máxima de 5% como a recomendada e segura.

O hidrogel foi preparado por método de evaporação do solvente (água e álcool isopropílico) (figura 4) usando polímeros formadores de filmes como hidroxipropilmetilcelulose (HPMC) e quitosana preparada e modificada segundo (Robert Gaf, 1992). Previamente foi preparado uma solução de quitosana à 3%, solubilizada com 1% de ácido acético (Robert Gaf, 1992) em água. Após, adicionado o HPMC e solubilizado com os solventes. Seguido em agitação por cerca de 15 minutos até a solubilização dos polímeros que resultou em uma solução translúcida e de baixa viscosidade. Em seguida, adicionou-se o OEM em diferentes concentrações (1,2 e 5%) conforme formulação descrita na tabela 2. Na sequência, foi verificado o pH para certificar-se que a formulação atendeu aos critérios de pH de estabilidade (pH 5,0 - 5,5) e após, foi vertida numa placa de Petri com auxílio de um funil para evitar evaporação rápida. Permaneceu em repouso por aproximadamente 24h para evaporação total do solvente.

Figura 4- Processo de obtenção do hidrogel e formação do filme polimérico



A: solução de quitosana acidificada. **B:** Solução de HPMC. **C:** HPMC+quitosana+OEM. **D:** Processo de evaporação (secagem). **E:** Produto em forma de filme polimérico.

Fonte: Próprio autor.

A embalagem escolhida para aplicação do hidrogel com OEM e nas unhas foi estratégica, fundamentada nos seguintes parâmetros (Figura 5):

- contribuir para aplicação eficaz na lâmina ungueal;
- embalagem econômica sem desperdício do produto;
- evitar o ressecamento do hidrogel antes da aplicação;
- menor exposição do hidrogel às contaminações externas;
- menor exposição dos ativos ao ambiente, preservando-os.

A remoção do produto, diferente dos esmaltes convencionais, não precisa ser com acetona ou outros solventes agressivos e tóxicos para a unha. Esta se faz com água através da fricção local.

Figura 5- Embalagem dispensadora do hidrogel para aplicação na lâmina ungueal



Fonte: Próprio autor.

4.3 Caracterização do Hidrogel

Para o processo de caracterização do material, foram desenvolvidas as seguintes amostras:

- Hidrogel sem quitosana (somente HPMC)
- Hidrogel com quitosana (HPMC + quitosana)
- Hidrogel com OEM 1%
- Hidrogel com OEM 2%
- Hidrogel com OEM 5%
- Filme + OEM 1%
- Filme + OEM 2%
- Filme + OEM 5%

4.3.1 Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC)

A análise de calorimetria exploratória diferencial foi realizada utilizando o equipamento TA Instruments modelo Discovery DSC 25. As amostras com massa de aproximadamente 7 mg foram submetidas ao aquecimento no intervalo de 25°C até 250°C, com razão de aquecimento de 10°C/min sob atmosfera de nitrogênio.

4.3.2 Termogravimetria (TG)

A estabilidade térmica das amostras foi avaliada utilizando o equipamento TA Instruments modelo Discovery TGA 55. As amostras com massa de aproximadamente 10mg foram submetidas ao aquecimento na faixa de temperatura de 25 a 700°C, com uma razão de aquecimento de 10°C/min sob atmosfera de nitrogênio.

4.3.3 Espectroscopia no Infravermelho por Transformada De Fourier (FTIR)

Foram analisadas em um equipamento de espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier, com modo ATR (Attenuated Total Reflectance), Spectrum 65 (Perkin Elmer). Os espectros de absorção foram obtidos na faixa de 4000 cm⁻¹ a 600 cm⁻¹, com resolução de 4 cm⁻¹ e com 32 scans de varredura.

4.4 Atividade Antifúngica

4.4.1 Microorganismos

Os microrganismos estudados nos ensaios microbiológicos foram os dois principais encontrados em onicomicoses: fungo dermatófito *Trichophyton rubrum* (*T. rubrum*) e a levedura *Candida albicans* (*C. albicans*). As cepas foram mantidas e cultivadas no Laboratório de Microbiologia da FCMS-PUC/SP sob supervisão da microbiologista Profa. Dra. Marcela Pellegrini Peçanha.

4.4.2. Determinação da Atividade Antifúngica

4.4.2.1. Teste de sensibilidade

Para o teste de sensibilidade determinou o halo de inibição e o comparativo com o padrão de antifúngicos (antifungigrama), que incluíram: clotrimazol, fluconazol, nistatina, cetoconazol, itraconazol e miconazol. Para tanto foram utilizadas as culturas puras de *T. rubrum* e *C. albicans* cultivadas em Caldo Brain Heart Infusion em estufa bacteriológica. A partir, dessas culturas puras, todas as placas de Petri com ágar sólido foram semeadas com os respectivos fungos, *T. rubrum* ou *C. albicans* e incubadas em estufas distintas, às temperaturas de 28 °C (por 7 dias, para adequada esporulação) ou 37 °C (por 24-48h), respectivamente. Cada condição foi realizada preferencialmente em triplicata e posterior análise e registro fotográfico com o auxílio de uma câmera Apple iPhone 14 de 12 megapixels com resolução de 4000x3000 pixels.

A escolha dos meios de cultura Sabouraud ou ágar Mycosel foram determinados para evitar contaminante como bactérias e fungos saprófitas (fungos não dermatofíticos). O uso do ágar Sabouraud, que é um meio de cultura seletivo para o cultivo de fungos e leveduras, e inibição de bactérias; se trata de um meio ácido (pH 5,6) que contém altos níveis de glicose, o que favorece o crescimento fúngico e inibe o crescimento bacteriano. Do mesmo modo o ágar Mycosel, é um meio de cultura seletivo para fungos, composto por cicloheximida e cloranfenicol que inibem o crescimento de fungos saprófitas e de bactérias. Entretanto, pode inibir o crescimento de alguns patogênicos importantes, como a *Candida sp*, assim, é necessário realizar simultaneamente meios de cultura sem cicloheximida, como é o caso do ágar Sabouraud.

Os protocolos experimentais adotados para avaliar a atividade antifúngica, foram meios de cultura sólido semeados com *T. rubrum* ou *C. albicans*:

- Ágar Sabouraud: discos de papel (6,35mm) embebidos com hidrogel sem e com OEM (1, 2 e 5%) e discos para antifungigrama (padrão de antifúngicos);
- Ágar Mycosel: discos de papel (6,35mm) embebidos com hidrogel sem e com OEM (1, 2 e 5%) e discos para antifungigrama (padrão de antifúngicos).

Também foram feitos testes pilotos com amostras de quitosana 3% (disco de papel 6,35mm) para verificar sua atividade antimicrobiana.

Todas as amostras foram incubadas em estufa bacteriológica (cfe descrito anteriormente) e após o tempo de cultivo, foram realizados:

- registros fotográficos;
- medições dos halos de inibição com o auxílio de uma régua.

Todas as análises dos resultados microbiológicos foram orientados e supervisionados pela microbiologista Profa. Dra. Marcela Pellegrini Peçanha.

4.4.2.2. Teste de turbidez

O teste de turbidez avaliou a concentração mínima do hidrogel associado com OEM (1, 2 e 5%) que inibe o crescimento microbiano, bem como, foram testados também o padrão de antifúngicos (antifungigrama, já mencionados anteriormente), todos com os ativos impregnados no disco de papel (diâmetro de 6,35mm). Todos os discos foram adicionados em tubos de ensaio contendo caldo Sabouraud cultivado com os fungos (dermatófito *T. rubrum* ou a levedura *C. albicans*) na concentração de $1,5 \times 10^3$ UFC/mL. Todas as amostras de dermatófito foram cultivadas em estufa bacteriológica à 28°C por 7 dias, e as de levedura foram cultivadas em outra estufa bacteriológica à 37°C por 1-2 dias. A análise da turbidez foi realizada com auxílio da escala nefelométrica de Mc Farland, que é o padrão de turvação que consiste na comparação macroscópica dos tubos de Nefelobac com os tubos de cultura fúngica e também foram realizados os registros fotográficos.

4.5 Análise Estatística

Os dados obtidos foram expressos como média $\pm$ erro padrão da média. Foi adotado o ANOVA seguido do teste post hoc de Tukey para análises estatísticas entre diferentes grupos. Diferenças significativas foram consideradas com $p < 0,05$. Utilizou-se a linguagem Python e o software PAST, versão 4.3, para todas as análises.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Caracterização do hidrogel

A Fig. 6 ilustra os espectros de FTIR das amostras HPMC, quitosana, OEM, etilenoglicol e propilenoglicol.

A amostra de HPMC apresenta banda de absorção em 3451, 2910 e um pico intenso 1059 cm^{-1} , correspondendo as vibrações de estiramento dos grupos O-H, C-H e C-O, respectivamente. Uma banda pouco intensa em 1630 cm^{-1} é característica da vibração de flexão dos grupos O-H, incluindo moléculas de água na região amorfa do HPMC (Aldraz *et al.*, 2024). Além disso, é observado em 1457 cm^{-1} uma vibração de flexão assimétrica do grupo CH_3 e um “ombro” em 1119 cm^{-1} vibração de estiramento assimétrica do grupo C-O-C (CuiCui *et al.*, 2015).

A amostra de quitosana apresenta uma banda de absorção larga na região de 3384 cm^{-1} , associada com a deformação axial dos grupos O-H e N-H de amina I e II, ambos os grupos ligados ao anel D-Glicopiranosídico. Uma banda de absorção em torno de 2888 cm^{-1} que corresponde ao estiramento simétrico e assimétrico de -CH-. Um pico pouco intenso em 1656 cm^{-1} referente à deformação axial de C=O de amida I. Um pico próximo a 1592 cm^{-1} relacionado à deformação angular da ligação N-H de amina I e II. Um pico de absorção em 1420 cm^{-1} característico de deformação angular de CH_2 e CH_3 . Um pico próximo a 1326 cm^{-1} referente à deformação angular de N-H de amida I. O pico em 1072 cm^{-1} indica a presença de ligações C-O e ligações glicosídicas, C-O-C, características da estrutura polissacarídica.

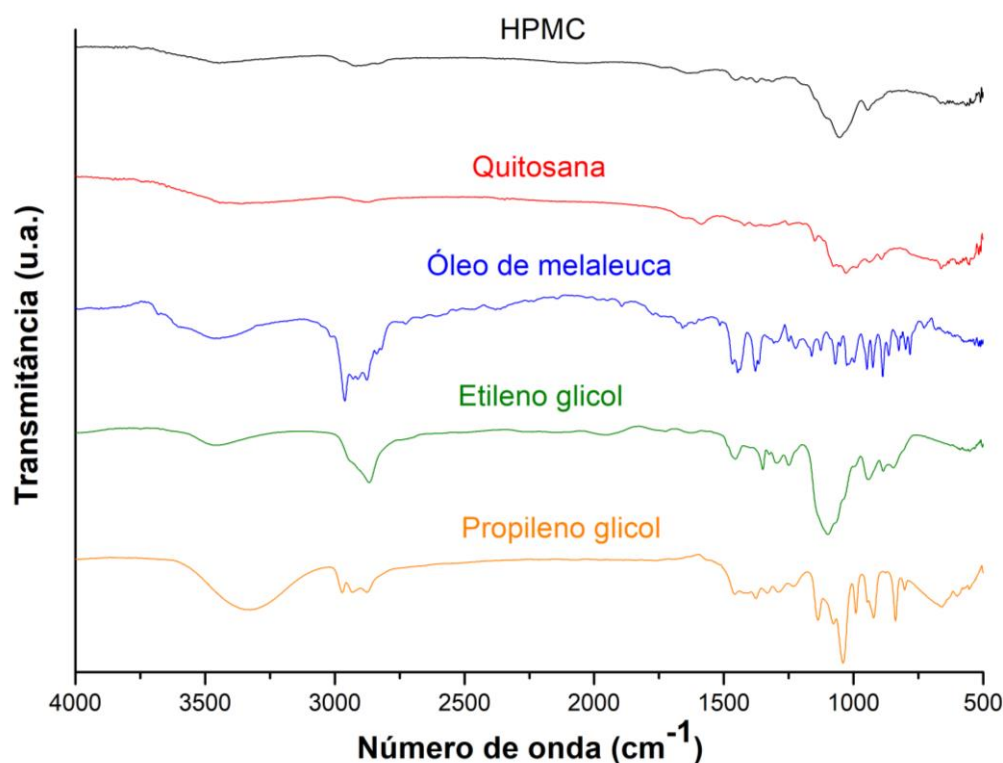
A amostra de EG apresentou banda em 3460 cm^{-1} referente ao estiramento do grupo O-H (Jianping *et al.*, 2006). Um “ombro” em 2950 cm^{-1} e um pico de estiramento em 2870 cm^{-1} estão relacionados o estiramento simétrico e assimétrico da ligação C-H. C-H do etilenoglicol, respectivamente (Tunney; Detellier, 1994).

A amostra de PG apresentou um pico bem pronunciado na região de 3332 cm^{-1} , referente ao estiramento do grupo O-H proveniente de álcoois. Observa-se, também, picos entre 2970 e 2880 cm^{-1} devido ao estiramento da ligação C-H e um outro pico intenso em 1045 cm^{-1} , atribuído ao estiramento da ligação C-O de álcoois (Wilkinson; Cavanagh, 2005).

A amostra de OEM apresentou uma banda em 3444 cm^{-1} referente as

vibrações das ligações O-H, picos em 2962, 2918 e 2881 cm^{-1} referente aos grupos sesquiterpenos (hidrocarboneto com 15 átomos de C), picos em 1445 e 1378 cm^{-1} referente ao estiramento das ligações C-H, um pico em 1652 cm^{-1} referente as ligações C=O (carbonilas), um pico em 998 cm^{-1} é referente a vibração da ligação C-O-C do composto cienol e um pico em 881 cm^{-1} referentes as ligações C-H das olefinas (Duarte Junior 2010).

Figura 6- Espectros de FTIR das amostras individualizadas



Fonte: Próprio autor.

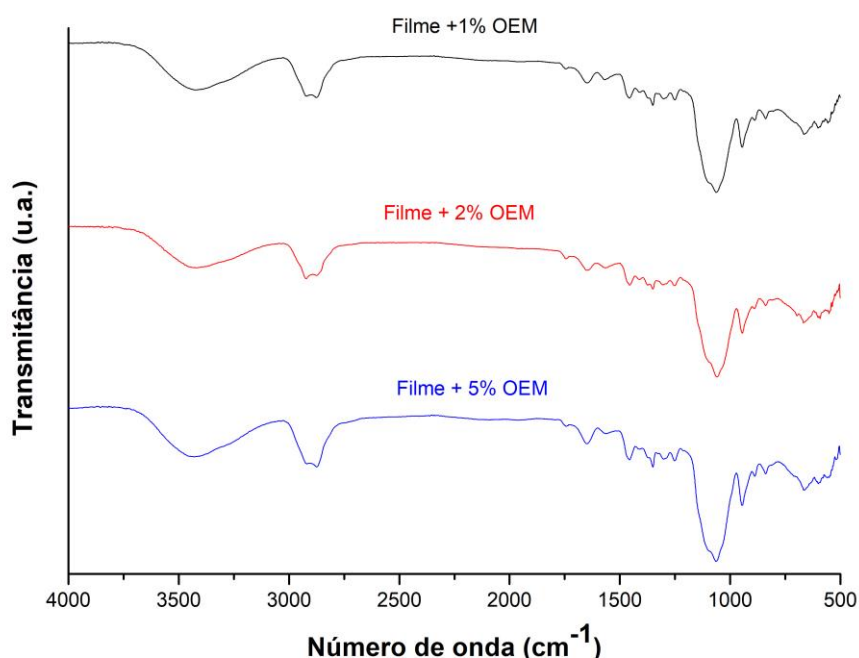
A Figura 7 ilustra os espectros de FTIR dos filmes com diferentes concentrações de OEM.

Os filmes com 1%, 2% e 5% OEM apresentaram os picos característicos do HPMC, quitosana e OEM sozinhos observados na Figura 6. Neste caso foram observados os principais picos/bandas em: 3435,8 cm^{-1} referente ao grupo O-H presentes nas amostras utilizadas na formulação do filme (HPMC, quitosana, OEM, EG e PG), 2915 e 2875 cm^{-1} referente ao estiramento das ligações C-H presentes nas amostras utilizadas na formulação do filme (HPMC, quitosana, OEM, EG e PG), 1656 cm^{-1} referente à deformação axial de C=O de amida I presente na quitosana, 1461 cm^{-1} e 1353 cm^{-1} referente ao estiramento das ligações C-H presentes no

OEM, 1300 cm^{-1} referente à deformação angular de N-H de amida I presente na quitosana, 1064 cm^{-1} atribuído ao estiramento da ligação C–O de álcoois, 942 cm^{-1} referente a vibração da ligação C-O-C do composto cienol. Em relação aos compostos individuais houve um pequeno deslocamento dos picos/bandas, o que pode ser atribuído a fraca interação entre os componentes do filme.

E por fim, outro ponto observado é que a mistura dos componentes não resultou no aparecimento de um novo pico/banda, indicando que não houve uma interação química entre eles. Isso é importante para liberação do OEM para o meio.

Figura 7- Espectros de FTIR dos filmes com diferentes concentrações de OEM

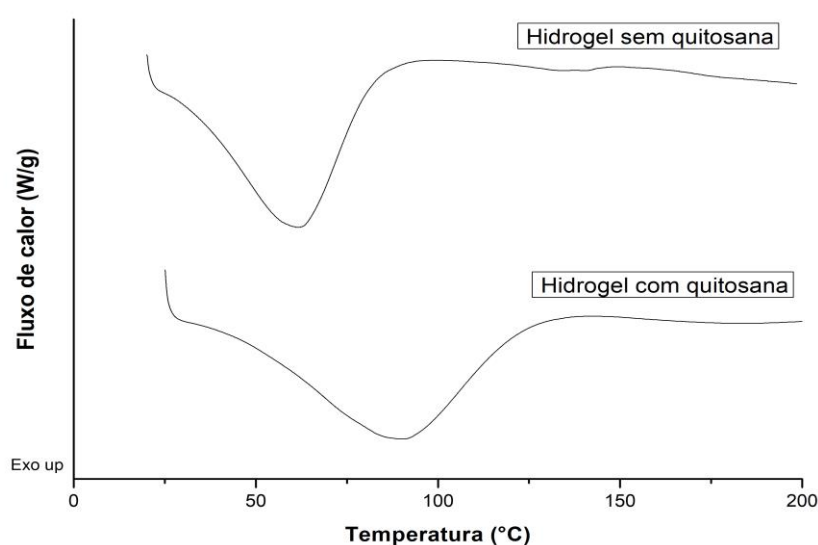


Fonte: Próprio autor.

A Figura 8 ilustra as curvas de DSC do hidrogel sem e com quitosana. É possível observar que ambas as amostras apresentaram um pico endotérmico, o qual está relacionado a vaporização dos solventes utilizados. Além disso, após a adição de quitosana no hidrogel houve um deslocamento do pico para temperatura maior (90°C). Isso ocorre devido as ligações de hidrogênio entre os grupos amino da quitosana e as moléculas de água, as quais reduzem as forças intermoleculares entre as moléculas de água e consequentemente, reduzem a pressão de vapor do sistema. Assim, uma temperatura mais alta, para que a pressão de vapor alcance a pressão atmosférica e o solvente vaporize, é necessária. Portanto, isto mostra que

a quitosana interage positivamente com as moléculas dos solventes, necessitando de maior energia para que a vaporização ocorra. Este resultado é consistente com encontrado por Duarte Junior (2010), onde a quitosana representou um pico endotérmico próximo de 100°C atribuído à evaporação de substâncias voláteis, como água ligada com os grupos hidroxilas da quitosana e demais componentes voláteis da composição.

Figura 8- Curva de DSC do hidrogel sem e com quitosana



Fonte: Próprio autor.

Os valores das temperaturas dos picos e das entalpias estão ilustrados na Tabela 2.

Tabela 2-Valores de entalpia e temperatura de peak (pico)

Amostras	Tpeak (°)	Entalpia (J/g)
Hidrogel sem quitosana	77	126
Hidrogel com quitosana	90	190

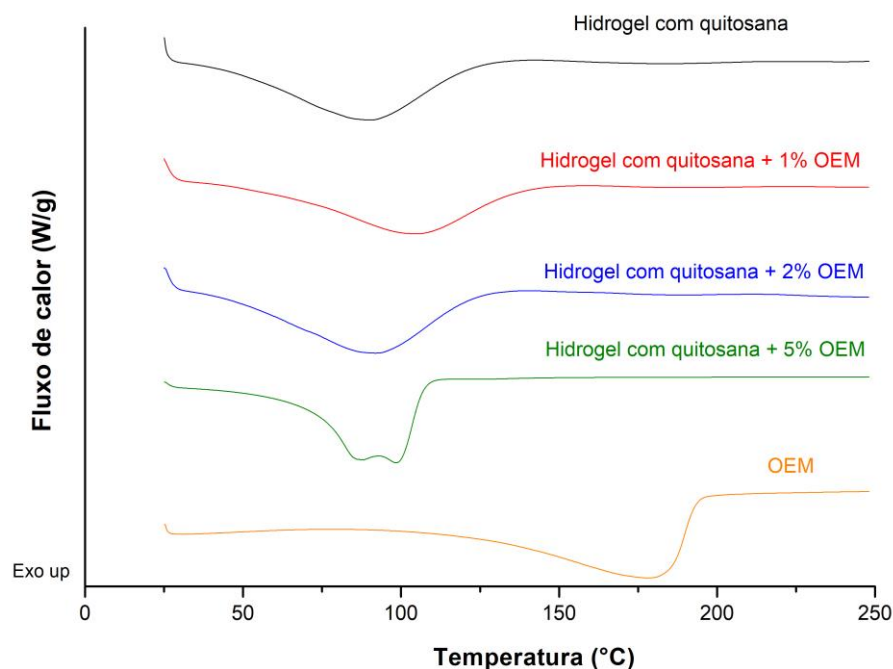
Fonte: Próprio autor.

Além disso, é possível observar na tabela 3 que o hidrogel com quitosana apresenta uma entalpia maior do que o hidrogel sem quitosana. Isso ocorre devido a presença da solução ternária (água, ácido acético e etanol) juntamente com a

quitosana, naquela amostra de solução com quitosana. Assim, mais largo será o pico do evento endotérmico, uma vez que a faixa de vaporização dos componentes é mais larga (água ~ 100 °C, etanol ~ 78 °C e ácido acético ~118 °C), devido a interação entre todos os componentes, do que a solução binária (água e etanol) presente na amostra do hidrogel sem quitosana. Além disso, a água interage com a quitosana resultando na necessidade de maior energia para vaporização da água, conforme discutido anteriormente em relação ao aumento da temperatura de pico.

A Figura 9 ilustra as curvas de DSC do hidrogel com quitosana acrescidas de 1, 2 e 5% OEM. É possível observar que a adição de 1% de melaleuca à solução formadora com quitosana, houve um deslocamento do pico para valor maior de temperatura. Isso pode ter ocorrido devido a maior interação entre os componentes da mistura, aumentando, assim, a temperatura do processo de vaporização desta amostra. Neste caso, o terpinen-4-ol, composto abundante presente no OEM (~40%) (Cortez *et al.*, 2021), interage com a quitosana, principalmente por ligações de hidrogênio entre o grupo OH do terpinen-4-ol e os grupos OH ou NH₂ da quitosana, aumentando, assim, a temperatura do pico. Por sua vez, o aumento na concentração do óleo de melaleuca, de 1 para 2%, pode ter causado uma diminuição da interação entre os componentes, devido a maior quantidade de moléculas lipofílicas que estão presentes na composição do OEM. Portanto, isso diminui a temperatura de vaporização dessa amostra comparada à amostra com 1% de melaleuca e o valor fica praticamente o mesmo da solução formadora com quitosana. E por fim, na solução formadora com 5% OEM houve um aparecimento de um pico duplo devido à grande concentração de óleo misturado aos componentes polares (água, etileno glicol e propilenoglicol), o que levou a separação das fases. Assim, o primeiro pico é próximo ao da solução formadora sem OEM, indicando a vaporização dos solventes utilizados para a preparação dessas amostras. O segundo pico é próximo ao da solução formadora com 1% OEM, indicando a vaporização do OEM.

Figura 9- Curva de DSC das amostras: hidrogel com quitosana, hidrogel com quitosana com 1% ou 2% ou 5% OEM



Fonte: Próprio autor.

Os valores das temperaturas dos picos e das entalpias estão ilustrados na Tabela 3. É possível observar na tabela 3 que a presença do OEM aumentou pouco a entalpia do sistema para a amostra com 1%, mostrando a maior necessidade de energia para que o processo de vaporização ocorra. Por outro lado, o aumento na concentração do OEM no sistema (2%) reduz um pouco a entalpia, porém o aumento para 5% do OEM na formulação aumenta substancialmente o valor de Entalpia. Isso pode estar relacionado a maior quantidade de OEM, o qual apresenta individualmente maior valor de Entalpia do que os demais componentes da formulação.

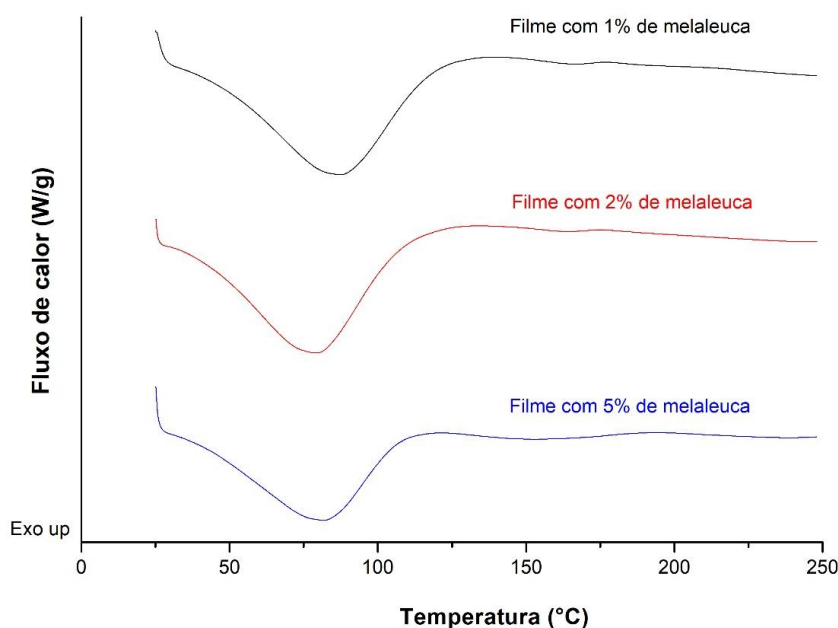
Tabela 3- Valores de entalpia e temperatura de pico

Amostras	Tpico (°C)	Entalpia (J/g)
Hidrogel com quitosana	90	190
Hidrogel com quitosana + 1% OEM	105	203
Hidrogel com quitosana + 2% OEM	92	175
Hidrogel com quitosana + 5% OEM	87 / 98	908

Fonte: Próprio autor.

A Figura 10 ilustra as curvas de DSC dos filmes com 1, 2 e 5% OEM. É possível observar que houve uma redução no valor da temperatura de vaporização com o aumento da concentração do OEM. Ou seja, com o aumento da quantidade de compostos lipofílicos no filme, menor a interação entre eles e o HPMC e a quitosana, resultando em menor temperatura do pico endotérmico.

Figura 10- Curva de DSC dos filmes com 1%, 2% e 5% OEM



Fonte: Próprio autor.

A tabela 4 ilustra os valores das temperaturas de pico e entalpia das amostras dos filmes com 1, 2 e 5% OEM. É possível observar a redução dos valores das temperaturas de pico e de entalpia à medida que a concentração do óleo aumenta. Portanto, mostrando que o aumento da concentração do óleo causa uma diminuição na interação entre o OEM e os componentes do filme (HPMC e quitosana), facilitando a vaporização do OEM.

Tabela 4- Valores de entalpia e temperatura de pico

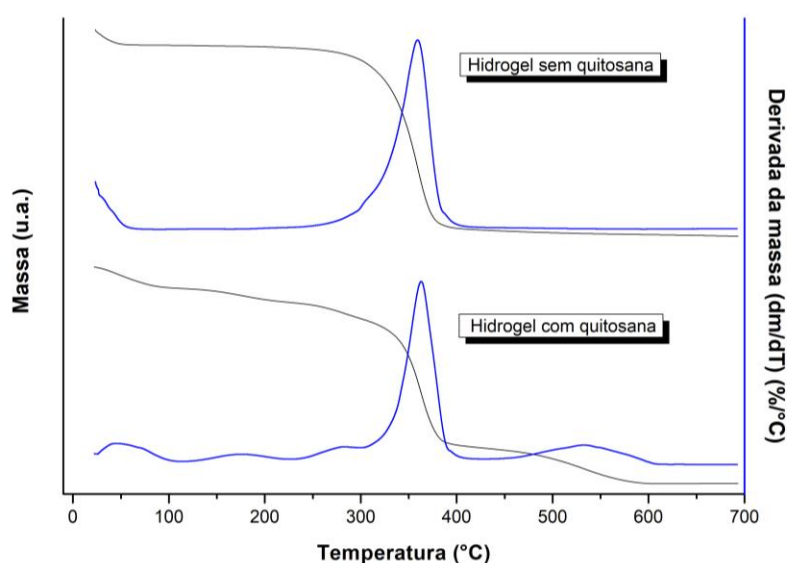
Amostras	Tpico (C°)	Entalpia (J/g)
Filme com 1% OEM	87	178
Filme com 2% OEM	79	170
Filme com 5% OEM	82	121

Fonte: Próprio autor

A Figura 11 ilustra as curvas termogravimétricas das soluções formadoras sem e com quitosana. De acordo com a Fig. 11 e os dados da Tabela 6, é possível observar que a solução formadora sem quitosana apresentou duas etapas de perda de massa. A primeira, com Tonset em 25°C, está relacionada à vaporização das moléculas dos solventes utilizados na preparação dessa amostra. A segunda, com Tonset em 310,0°C, está relacionada à degradação do HPMC.

A solução formadora com quitosana apresentou cinco etapas de perda de massa. As duas primeiras, com valores de Tonset em 25 e 146°C, estão relacionadas à vaporização dos solventes. A terceira e a quarta etapa de perda de massa, Tonset em 259 e 344°C, estão relacionadas à degradação do HPMC. E a quinta etapa de perda de massa, Tonset em 498°C, está relacionada à degradação da quitosana. Portanto, a presença da quitosana não alterou a estabilidade térmica da solução formadora (hidrogel).

Figura 11- Curvas termogravimétricas do hidrogel sem e com quitosana



Fonte: Próprio autor.

A Tabela 5 ilustra os valores de Tonset, Tendset e Tpeak das soluções formadoras(hidrogel) sem e com quitosana.

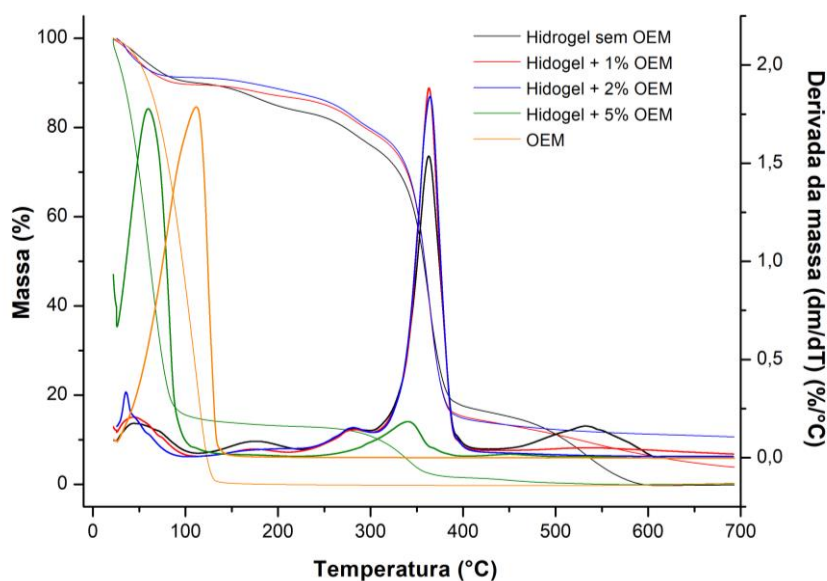
Tabela 5- Valores de Tonset, Tendset e Tpeak das soluções formadoras(hidrogel) sem e com quitosana

Amostras	Tonset (°C)	Tendset (°C)	Tpeak (°C)
Sem quitosana	25 / 310	34 / 368	358
Com quitosana	25 / 146 / 259 / 344 / 498	79 / 198 / 312 / 369 / 562	47 / 171 / 275 / 364 / 533

Fonte: Próprio autor.

A Figura 12 ilustra as curvas termogravimétricas da solução formadora com quitosana, solução formadora com quitosana + 1% OEM e solução formadora com quitosana + 2% OEM. Observando as curvas desta figura e os valores da tabela 5, é possível observar que a adição do óleo de melaleuca praticamente não alterou o comportamento térmico da solução formadora com quitosana. A maior diferença é que a adição do óleo inibiu o aparecimento do quinto pico de DTG, o qual está relacionado à degradação da quitosana.

Figura 12- Curvas termogravimétricas das amostras: solução formadora com quitosana, solução formadora com quitosana + 1% ou 2% ou 5% OEM



Fonte: Próprio autor.

A Tabela 6 ilustra os valores de Tonset, Tendset e Tpeak das soluções formadora com quitosana, solução formadora com quitosana com 1% ou 2% ou 5% OEM.

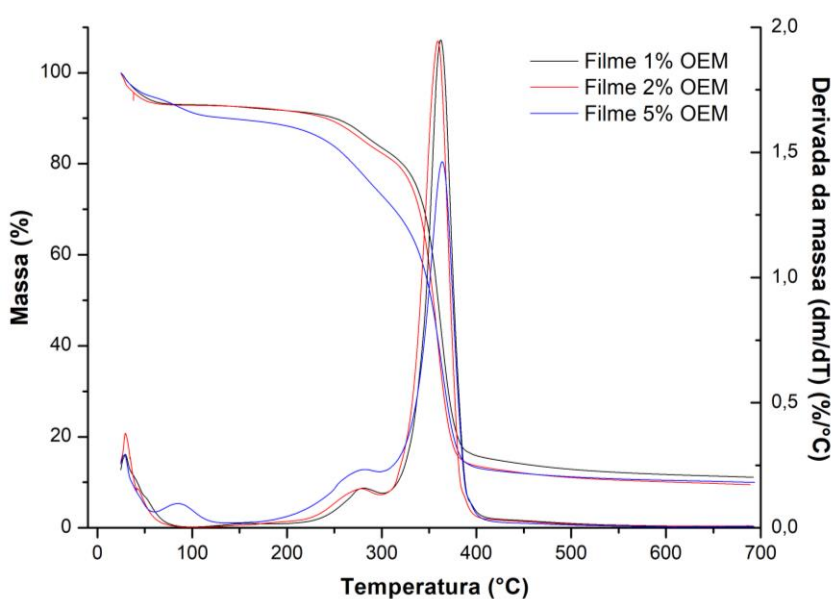
Tabela 6- Valores de Tonset, Tendset e Tpeak do hidrogel com quitosana, solução formadora com quitosana com 1% ou 2% ou 5% OEM

Amostras	Tonset (°C)	Tendset (°C)	Tpeak (°C)
Hidrogel com quitosana	25 / 146 / 259 / 344 / 498	79 / 198 / 312 / 369 / 562	47 / 171 / 275 / 364 / 533
1% OEM	25 / 151 / 263 / 336	76 / 197 / 239 / 371	44 / 174 / 279 / 362
2% OEM	25 / 144 / 258 / 335	62 / 207 / 290 / 380	35 / 177 / 280 / 364
5% OEM	22 / 308	83 / 357	59 / 340

Fonte: Próprio autor.

A Figura 13 ilustra as curvas termogravimétricas dos filmes com 1% OEM e com 2% OEM. De acordo com as curvas da Fig. 13 e os dados da tabela 6 é possível observar que a concentração de OEM não influenciou a propriedade térmica das amostras, mostrando, assim, que a concentração é uma componente que pode ser variada na composição, visando o aumento da capacidade bactericida/fungicida do produto, sem comprometer a propriedade térmica do produto final.

Figura 13- Curvas termogravimétricas dos filmes com 1, 2 e 5% OEM



Fonte: Próprio autor.

Tabela 7- Filmes com 1,2 e 5% de OEM

Amostras	Tonset (°C)	Tendset (°C)	Tpeak (°C)
Filme com 1% OEM	25 / 259 / 332	59 / 316 / 381	29 / 279 / 362
Filme com 2% OEM	25 / 253 / 333	57 / 291 / 381	34 / 277 / 362
Filme com 5% OEM	25 / 72 / 345	36 / 275 / 365	28 / 271 / 363

Fonte: Próprio autor.

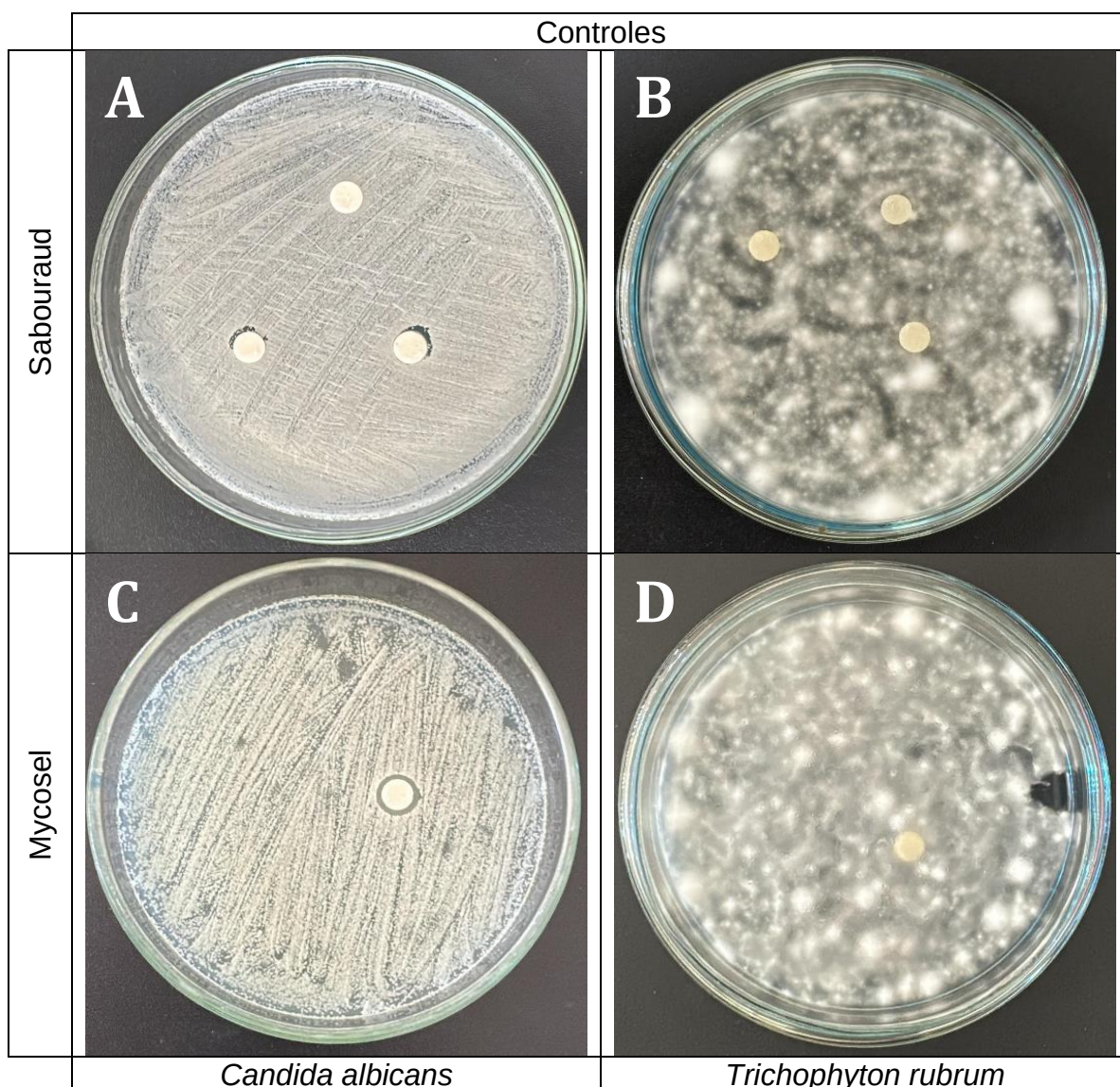
5.2 Atividade antifúngica

Os microrganismos estudados foram os dois principais encontrados em onicomicoses: o fungo dermatófito *T. rubrum* e a levedura *C. albicans*.

Primeiramente, investigou-se a possível propriedade antimicrobiana da quitosana já relatada na literatura, pois este componente foi incluído à formulação por conferir adesividade e gelificação. E também analisou se todos os componentes presentes no hidrogel sem OEM (HPMC, PPG, PEG, álcool isopropílico) possuíam alguma atividade antifúngica, porém somente a quitosana, na concentração estudada, apresentou propriedade antifúngica para a *C. albicans* (halo de inibição 9mm), mas não para o *T. rubrum*, como visto na Figura 15.

Apesar de seu mecanismo de ação não estar totalmente elucidado, a quitosana provou ser ativa contra os gêneros *Staphylococcus*, *Bacillus*, *Streptococcus*, *Salmonella* e também contra as leveduras *Candida albicans* e *Candida dubliniensis* (Amalraj et al., 2020; Barzegar et al., 2021; Matica et al., 2019; Rodrigues-Vázquez et al., 2015) corroborando com os resultados deste trabalho, efeito inibidor discreto da quitosana contra a levedura *C. albicans* apenas no ágar Mycosel.

Figura 14- Atividade antifúngica contra *C. albicans* e *T. rubrum* nos meios de cultura sólido: controle Hidrogel sem OEM e controle Quitosana



A) discos contendo hidrogel sem OEM em ágar Sabouraud com *C. albicans* (em triplicata). **B)** discos contendo hidrogel sem OEM em ágar Sabouraud com *T. rubrum* (em triplicata). **C)** discos contendo somente quitosana em ágar Mycosel com *C. albicans*. **D)** discos contendo somente quitosana em ágar Mycosel com *T. rubrum*.

Fonte: Próprio autor

Na análise microbiológica do hidrogel com OEM nas concentrações de 1, 2 e 5% observaram que as maiores concentrações (2 e 5%) apresentaram halos de inibição de crescimento contra a *C. albicans* tanto no ágar Sabouraud quanto no ágar Mycosel. Já na cultura com *T. rubrum* o halo de inibição não foi detectado ou demasiado discreto (Tabela 8 e Figura 15).

Tabela 8- Atividade antifúngica contra *C. albicans* ou *T. rubrum* em ágar Sabouraud e ágar Mycosel, com posterior inclusão de discos embebidos em hidrogel com OEM (1, 2 e 5%)

A

Sabouraud+ <i>C. albicans</i>	OEM 1% (mm)	OEM 2% (mm)	OEM 5% (mm)
1	0	15,0	12,0
2	0	10,0	12,0
3	0	13,0	14,0
Média	0*	12,7	12,7
EPM	0	1,1	0,7

B

Sabouraud+ <i>T. rubrum</i>	OEM 1% (mm)	OEM 2% (mm)	OEM 5% (mm)
1	0	9,0	8,0
2	0	0	0
3	0	0	0
Média	0	3,0	2,3
EPM	0	3,0	2,7

C

Mycosel+ <i>C. albicans</i>	OEM 1% (mm)	OEM 2% (mm)	OEM 5% (mm)
1	8,0	13,0	14,0
2	7,0	12,0	13,0
3	0	11,0	10,0
Média	7,5*	12,0	12,3
EPM	2,5	0,6	1,2

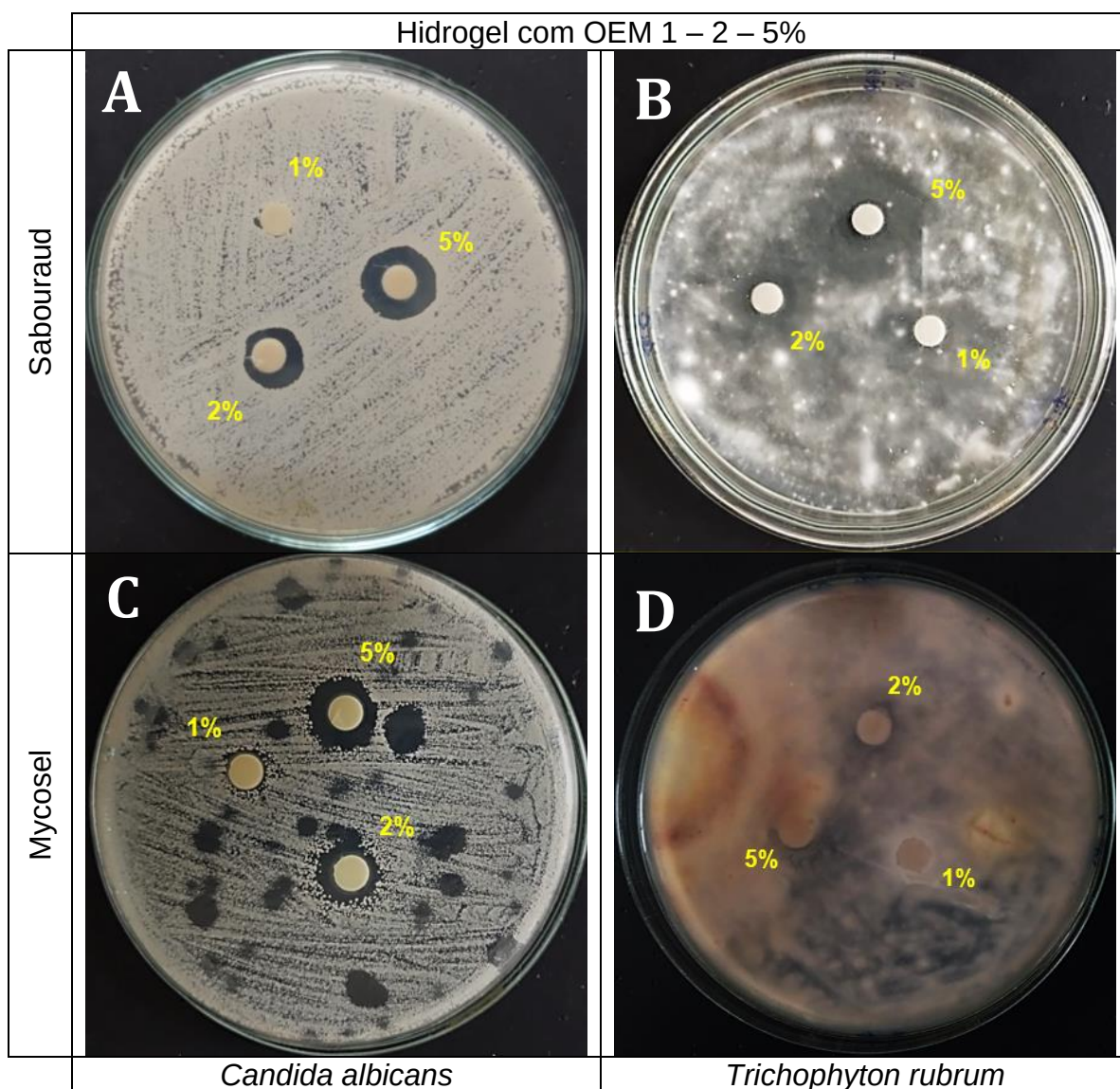
D

Mycosel+ <i>T. rubrum</i>	OEM 1% (mm)	OEM 2% (mm)	OEM 5% (mm)
1	0	0	7,0
2	0	0	7,0
3	0	0	7,0
Média	0	0	7,0*
EPM	0	0	0

A) OEM 1% com $*p < 0,05$ quando comparado com as demais concentrações superiores. Não houve diferença significativa entre 2 e 5% de OEM. B) $p > 0,05$ nas diferentes concentrações. C) $*p < 0,05$ quando comparado com as demais concentrações. Não houve diferença significativa entre 2 e 5% de OEM. B) OEM 5% com $*p < 0,05$ quando comparado com as demais concentrações inferiores. Testes em triplicata. M; média. EMP: erro padrão da média. Unidade de medida: milímetro (mm).

Fonte: Próprio autor

Figura 15- Atividade antifúngica contra *C. albicans* e *T. rubrum* nos meios de cultura sólido: Hidrogel com OEM (1, 2 e 5%)



A) discos contendo hidrogel com OEM (1,2 e 5%) em ágar Sabouraud com *C. albicans*. **B)** discos contendo hidrogel com OEM (1,2 e 5%) em ágar Sabouraud com *T. rubrum*. **C)** discos contendo hidrogel com OEM (1,2 e 5%) em ágar Mycosel com *C. albicans*. **D)** discos contendo hidrogel com OEM (1,2 e 5%) em ágar Mycosel com *T. rubrum*. As placas de ágar Sabouraud e Mycosel com cultivo da levedura.

Fonte: Próprio autor

As concentrações de 2 e 5% de OEM não foram significativa diferentes na inibição do crescimento fúngico, porém vale ressaltar que no uso clínico crônico a indicação seria a reaplicação diária durante até 24 semanas dependendo de cada caso, e isso potencializaria a eficácia do tratamento, pois nesse desenho experimental a administração é única, e o óleo essencial evapora da formulação com passar do tempo. Segundo os estudos de Flores (2011) evidenciou-se a utilização de *Melaleuca* como um potente ativo para diversas infecções fúngicas, sugerindo que o uso tópico

de óleo essencial de Melaleuca à concentração de 5%, durante 8 semanas foi capaz de curar as onicomicoses. Além disso, o uso tópico do óleo puro (100% de óleo) não é aconselhado, sendo indicada diluição, considerando a concentração de até 5% como não irritante, baixíssimo percentual de irritação quando utilizados preparações tópicas como cremes, loções e géis, todos considerados como não genotóxicos, sem efeitos deletérios consideráveis (Abdelhamid, 2017; Silva, 2010).

As propriedades do óleo essencial pode oferecer muitas possibilidades no tratamento das onicomicoses, pois o seu principal componente o terpinen-4-ol é uma potente fonte medicinal antimicrobiana, atuando na síntese de ergosterol na membrana dos fungos, desestruturando e promovendo ruptura celular (Nepomoceno; Pietrobon, 2020), além de danos a organelas intracelulares, deixando-as vulneráveis (Yu *et al.*, 2015).

O OEM nas concentrações mais altas apresentou inibição do crescimento mais eficaz contra a levedura *C. albicans*, corroborando com os achados de Juliano, Demurtas e Piu (2008). Logo, foi menos eficaz no efeito fungitóxico para *T. rubrum*, sugerindo duas hipóteses:

- Primeira hipótese: a volatilização do OEM exposto a temperatura alta na estufa, em um meio de cultura sólido passível de ressecamento, preocupação esta já verificada através dos estudos realizados por Flores (2011) que concluiu que a inclusão do óleo de Melaleuca nas nanocápsulas mostraram maior proteção contra a volatilização.
- Segunda hipótese: um possível mecanismo de resistência microbiana, como descrita por Martinez-Rossi, Peres e Rossi (2007) que identificaram bombas de efluxo na membrana plasmática do gênero *Trichophyllum*, que são responsáveis pela resistência a múltiplas terapias antifúngicas, logo impedindo o mecanismo de ação do OEM, onde os seus fitoquímicos atuam em organismos fúngicos infligindo danos em suas membranas celulares, com extravasamento de conteúdo intracelular, além de promover déficit da produção de energia celular com redução de trifosfato de adenosina (Felipe, 2018, Miron *et al.*, 2014; Yu *et al.*, 2015).

Uma proposta na tentativa de aumentar o efeito fungitóxico do OEM contra o dermatófito e leveduras, seria formulações a base de sistemas nanoestruturados como descrita por Flores *et al.* (2013) que evidenciaram uma maior eficácia quando comparadas nanocápsulas contendo OEM com nanoemulsão e emulsão

convencional. Nanocápsulas, ao contrário das nanoemulsões, são formados por uma parede polimérica disposta ao redor do núcleo de óleo, que protege a entrega imediata do OEM, fornecendo uma liberação gradual e mantendo suas concentrações por mais tempo.

A cepa da levedura *C. albicans* estudada apresentou sensibilidade a todos os ativos, exceto aos antifúngicos triazólicos Itraconazol e Fluconazol (Tabela 10A). O mecanismo de resistência de leveduras não estão totalmente elucidados e podem representar uma seleção bastante inespecífica contra a permeabilidade da membrana a esses fármacos (Fotos; Vincent; Hellstein, 1992). Diferentemente dos dados aqui encontrados, pesquisas científicas relatam o desenvolvimento de resistência cruzada de *C. albicans* a vários imidazóis, como cetoconazol, clotrimazol e miconazol (Holt; Azmi, 1978) (Tabela 10A). Estes resultados são clinicamente imprescindíveis para enfatizar a necessidade de um diagnóstico micológico adequado, incluindo o antifungograma e delineamento do tratamento antifúngico com azóis assertivos.

Apesar da média do halo de inibição com OEM ser menor, não houve diferença significativamente em relação aos antifúngicos como micronazol, cetoconazol, clotrimazol e nistatina, mostrando que o OEM possui atividade antifúngica. Sugere-se que o efeito fungitóxico, se deve ao ativo Terpinen-4-ol que está presente em 30-40% da composição do OEM, sendo o componente que detém a principal atividade antimicrobiana, pois induz perda da membrana, interferindo na integridade e fisiologia bacteriana (Carson; Hammer; Riley, 2006).

As concentrações estudadas de 1, 2 e 5% de OEM é mais a segura e indicada na literatura como a faixa de concentração inibitória mínima (CIM, ou seja, a menor concentração do agente antimicrobiano capaz de inibir o desenvolvimento do microrganismo) contra os agentes microbianos mais comuns em onicomicose, podendo variar de 0,5 a 5% em fórmulas magistrais (Flores *et al.*, 2013; Garcia, 2003).

Muitos artigos científicos avaliando a fungitoxicidade do óleo de maleluca, vem de encontro com achados deste trabalho, pois demonstraram amplo espectro de ação antibacteriana, com efeito bactericida *in natura* e bacteriostático em baixas concentrações (Kwieciński; Eick; Wójcik, 2019; Wilkinson; Cavanagh, 2005) bem como ação fungicida/fungitástico (Oliva, 2003; Traboulsi; Mukherjee; Ghannoum, 2007) e antiviral (Oliva, 2003).

O dermatófito *T. rubrum* foi sensível a todos os padrões de antifúngicos testados (antifungograma) e também apresentou sensibilidade tênue ao OEM, em

especial as concentrações maiores (2 e 5%) (Tabela 10B), provavelmente devido a evaporação do óleo dentro da estufa microbiológica. Vale ressaltar que o *T. rubrum* demanda de um tempo de incubação maior do que para leveduras, pois o dermatófito produz esporos, que são estruturas de reprodução que permitem a propagação do fungo. Assim, surgiu a preocupação da evaporação do OEM devido ao período prolongado na estufa em um ambiente relativamente quente e que propiciou a volatilidade do óleo, com perda da função fungitóxica, o que promove novamente a reflexão de desenvolver nanoestruturas para encapsulamento do OEM (Flores, 2011).

Tabela 9- Antifungigrama e Hidrogel com OEM (1, 2 e 5%) contra *C. albicans* e *T. rubrum* nos ágar Sabouraud (A e B) e ágar Mycosel (C e D)

A

Mycosel+ <i>C. albicans</i>	OEM 1%	OEM 2%	OEM 5%	Mico	Ceto	Clot	Itra	Nist	Fluc
1	9,0	9,0	14,0	15,0	17,0	15,0	0	22,0	0
2	11,0	8,0	7,0	13,0	22,0	12,0	0	13,0	0
3	8,0	8,0	8,0	10,0	20,0	10,0	0	18,0	0
M	9,3	8,3	9,7	12,7	19,7	12,3	0*	17,7	0*
EP	0,9	0,3	2,2	1,4	1,4	1,4	0	2,6	0

B

Mycosel+ <i>T. rubrum</i>	OEM 1%	OEM 2%	OEM 5%	Mico	Ceto	Clot	Itra	Nist	Fluc
1	8,0	13,0	14,0	35,0	40,0	40,0	40,0	26,0	40,0
2	12,0	12,0	11,0	32,0	30,0	50,0	40,0	30,0	40,0
3	0	0	8,0	40,0	40,0	30,0	0	28,0	0
M	6,7	8,3	11,0	35,7	36,7	40,0	26,7	28,0	26,7
EP	3,5	4,2	1,7	2,3	3,3	5,8	13,3	1,1	13,3

A) não houveram diferença significativa entre as concentrações de OEM (* $p < 0,05$ quando comparado com as demais). **B)** não houveram diferença significativa entre as concentrações de OEM. Legenda dos antifúngicos: Mico: miconazol; Ceto: cetoconazol; Clot: clotrimazol; Itra: itraconazol; Nist: nistatina e Fluc: fluconazol. M; média. EMP: erro padrão da media. Unidade de medida: milímetro (mm).

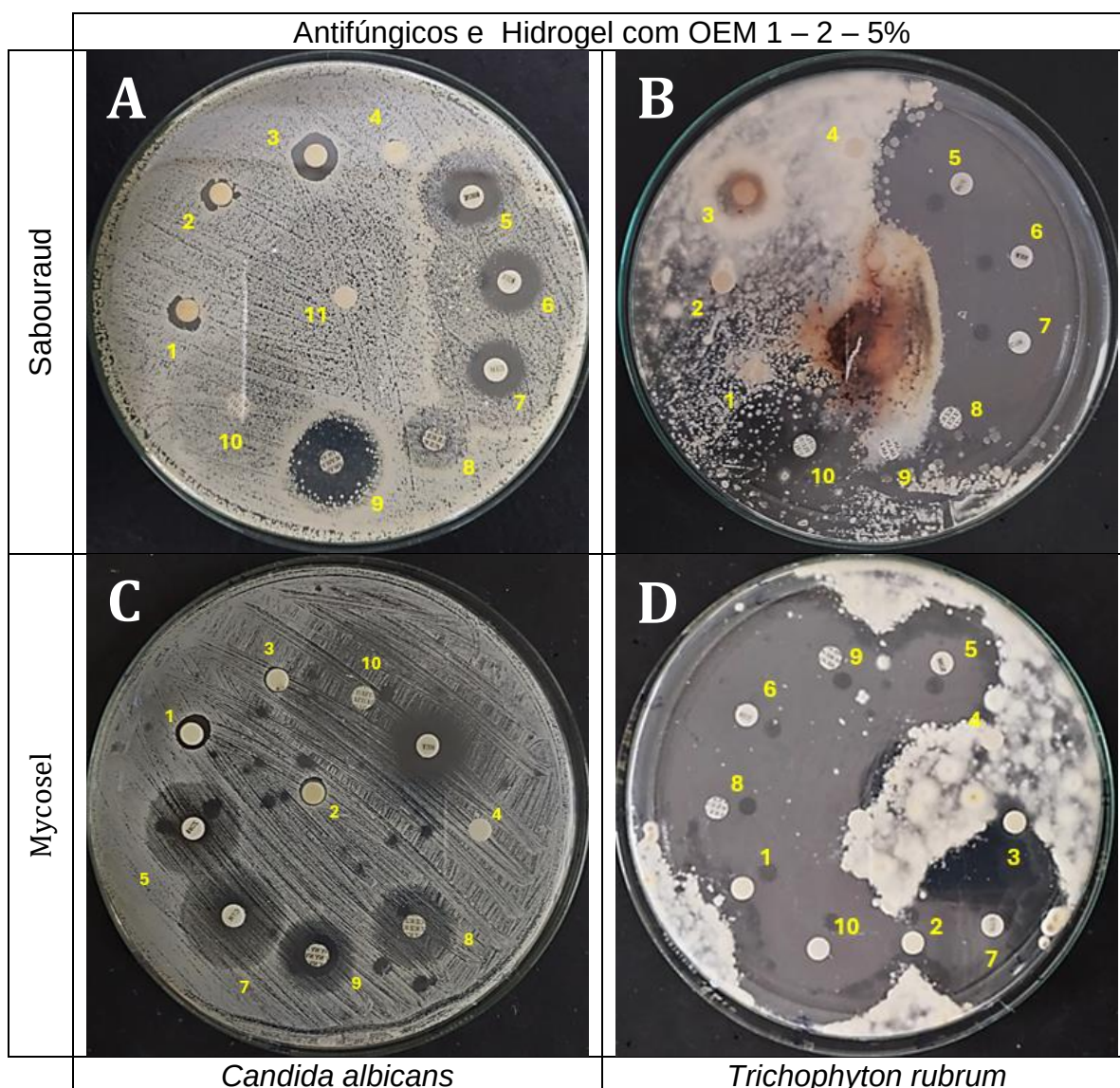
Fonte: Próprio autor

A sensibilidade demonstrada pelo *T. rubrum* a todos os antifúngicos azólicos testados (imidazóis: miconazol e cetonazol; triazóis: itraconazol, fluconazol, voriconazol; Figura 17) se deve a um mecanismo de ação comum desses fármacos: previnem a síntese de ergosterol, o principal componente de esterol das membranas plasmáticas fúngicas, por meio da inibição da enzima lanosterol 14- α -desmetilase dependente do citocromo P450 fúngico (Laurent; Monod, 2017; Odds; Brown; Gow, 2003). A depleção resultante de ergosterol e o acúmulo concomitante de precursores

14- α -metilados interferem na função principal do ergosterol nas membranas fúngicas e alteram tanto a fluidez da membrana quanto a atividade de diversas enzimas ligadas à membrana (por exemplo, quitina sintase). O efeito é a inibição do crescimento e da replicação fúngica. Além disso, vários outros efeitos secundários, como a inibição da transformação morfogênética, diminuição da aderência fúngica e efeitos tóxicos diretos sobre os fosfolípidios da membrana (Laurent; Monod, 2017).

Similar ao desenho experimental e achados, Laurent e Monod (2017) testaram padrões de antifúngicos (antifungigrama) com *T. rubrum* e concluíram que associações de diferentes inibidores da biossíntese do ergosterol (amorolfina + sertaconazol ou sulconazol), atuando em alvos diferentes potencializaram o efeito antifúngico.

Figura 16- Antifungigrama e Hidrogel com OEM (1, 2 e 5%) contra *C. albicans* e *T. rubrum* nos meios de cultura sólido: ágar Sabouraud (A e B) e ágar Mycosel (C e D)



A) ágar Sabouraud com *C. albicans*: OEM 5%. **B)** ágar Sabouraud com *T. rubrum*. **C)** ágar Mycosel com *C. albicans*. **D)** ágar Mycosel com *T. rubrum*. Legenda dos discos: **1.** OEM 1%. **2.** OEM 2%. **3.** OEM 5%. **4.** Quitosana. **5.** Miconazol, **6.** Cetoconazol, **7.** Clotrimazol, **8.** Itraconazol, **9.** Nistatina, **10.** Fluconazol.

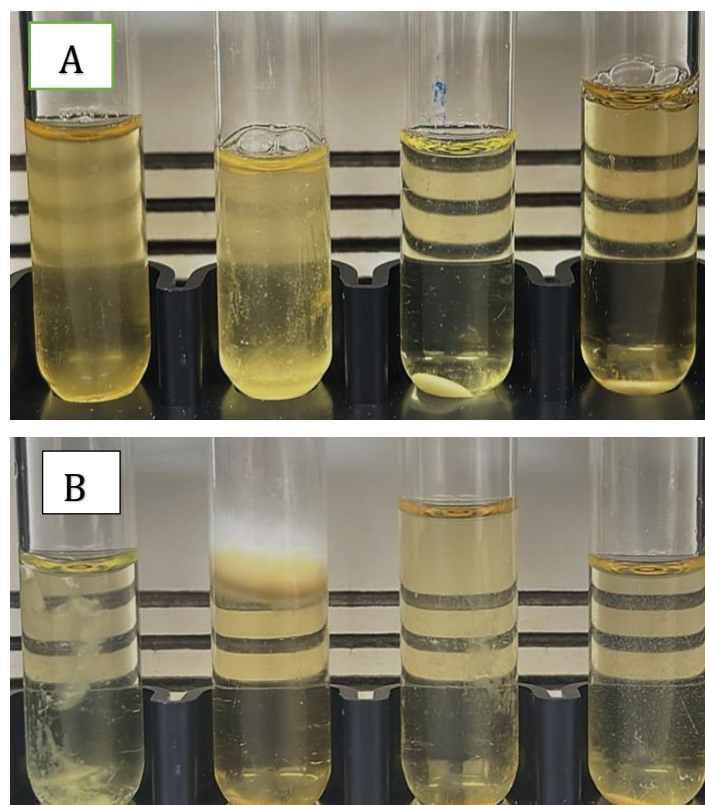
Fonte: Próprio autor

Como forma de complementar os resultados obtidos nos antifungigramas de *C. albicans* e *T. rubrum*, as amostras de hidrogel com OEM (1,2 e 5%) foram incubadas em caldo Sabouraud e analisada a turbidez do meio de cultivo, conforme mostrado na Figura 18A. Resultados estes que corroboraram com os testes de sensibilidade com o OEM, demonstrando que o crescimento do dermatófito *T. rubrum* não foi inibido em contato com o OEM na menor concentração (1%), mas foi inibido nas concentrações superiores (2 e 5%) (Figura 18A), e que este fungo foi sensível os todos os padrões de antifúngicos testados (Figura 19B), fato este que se deve a inibição da síntese do

ergosterol, principal componente da membrana plasmática fúngica, que resulta em depleção do crescimento e replicação do fungo. A turbidez negativa para as concentrações maiores de OEM (2 e 5%) pode ser tratar de caldo, um meio de cultura líquido, onde a evaporação do OEM não ocorre ou é parcialmente impedido, portanto com efeito inibidor do crescimento, o efeito antifúngico do óleo é mais efetivo e duradouro, corroborando com os achados de Flores (2011).

Do modo semelhante, para a levedura *C. albicans*, o teste de turbidez também foi positivo para OEM a 1% e negativo para as demais concentrações (Figura 18B). Já com os experimentos realizados com os padrões de antifúngicos, a levedura se mostrou resistente aos antifúngicos Itraconazol e fluconazol (figura 19B). Esses testes de turbidez positivos mostraram uma equivalência de 3 bilhões de microorganismos por mL de meio (30×10^3) pela escala nefelométrica de Mc Farland.

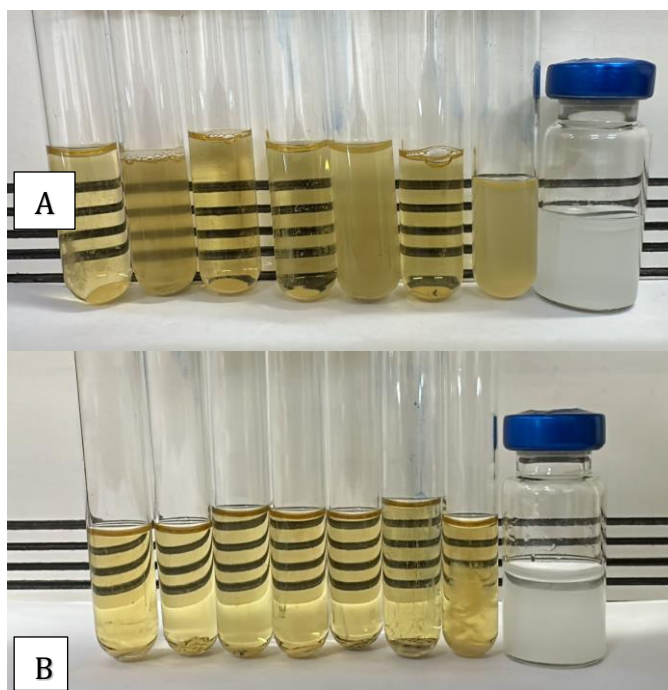
Figura 17- Teste de Turbidez: Caldo Sabouraud cultivado com *T. rubrum* e *C. albicans*.+ OEM 1%, 2 % e 5%



Teste de turbidez: caldo Sabouraud cultivado com *T. rubrum* (A) ou com *C. albicans* (B) + OEM (1, 2 e 5%). Da esquerda para direita: A) Controle *C. albicans*, OEM 1% + *C. albicans*, OEM 2% + *C. albicans*, OEM 5% + *C. albicans*. B) Controle *T. rubrum*, OEM 1% + *T. rubrum*, OEM 2% + *T. rubrum*, OEM 5% + *T. rubrum*.

Fonte: Próprio autor

Figura 18- Teste de Turbidez: Caldo Sabouraud cultivado com *T. rubrum* e *C. albicans*.+ Antifungigrama



Teste de turbidez: caldo Sabouraud cultivado com *C. albicans* ou com *T. rubrum*. Da esquerda para direita: **A)** antifúngicos Clot, Fluc, Mico, Nist, Itra, Ceto, controle *C. albicans*, **B)** antifúngicos Clot, Flu, Mic, Nist, Itra, Ceto, controle *T. rubrum*, frasco 10 da escala de Mc Farland;
 Legenda dos antifúngicos: Mico: miconazol; Ceto: cetoconazol; Clot: clotrimazol; Itra: itraconazol; Nist: nistatina e Fluc: fluconazol
 Fonte: Próprio autor.

6 CONCLUSÃO

Diante dos resultados obtidos, o presente estudo demonstrou que a incorporação de óleo essencial de *Melaleuca* em matrizes poliméricas de hidroximetilcelulose (HPMC) e quitosana resultou na formação de um hidrogel para aplicação tópica no tratamento da onicomicose. As análises espectroscópicas por FTIR do hidrogel com OEM apresentou bandas características de seus componentes majoritários e mostrou que não houve interação química entre os componentes, sendo isto importante para garantir a liberação do OEM. As análises térmicas (DSC e TG) revelaram alterações nos perfis de degradação e transição térmica dos biopolímeros após a adição do óleo essencial, sugerindo uma modificação estrutural compatível com a formação de um sistema estável.

Do ponto de vista microbiológico, o hidrogel apresentou atividade antifúngica frente às cepas de *Candida albicans* e *Trichophyton rubrum*, microrganismos comumente associados à onicomicose. Tais resultados indicam que a formulação desenvolvida possui capacidade de inibir o crescimento fúngico, o que reforça o potencial terapêutico do sistema proposto. Além disso, a escolha de materiais naturais como a quitosana e o óleo essencial de *Melaleuca*, está alinhada com a demanda atual por produtos sustentáveis e seguros para aplicações farmacêuticas. A combinação das propriedades filmógenas, atividade antimicrobiana e estabilidade térmica sugere que o hidrogel desenvolvido constitui uma alternativa promissora para o tratamento tópico de infecções ungueais, especialmente em contextos onde a resistência a antifúngicos convencionais representa um desafio clínico. Contudo, ressalta-se a necessidade de estudos complementares, incluindo ensaios de liberação do ativo, testes de permeação ungueal e avaliações in vivo, a fim de validar a eficácia e segurança da formulação em condições mais próximas da aplicação clínica. Assim, os achados desta pesquisa fornecem uma base sólida para o avanço do desenvolvimento de sistemas tópicos inovadores e bioativos no campo da terapêutica antifúngica.

REFERÊNCIAS

- ABD RASHED, A.; RATHI, D. G.; AHMAD NASIR, N. A. H.; ABD RAHMAN, A. Z. Antifungal properties of essential oils and their compounds for application in skin fungal infections: conventional and nonconventional approaches. **Molecules**, v. 26, n. 4, p. 1093, 2021. DOI [10.3390/molecules26041093](https://doi.org/10.3390/molecules26041093). Disponível em: <https://www.mdpi.com/1420-3049/26/4/1093>. Acesso em: 12 jun. 2024.
- ABDELHAMID, D.; GOMAA, A. H. A.; MOHAMMED, G. F.; EYADA, M.; EL-SWEIFY, M. A. Evaluation of the therapeutic efficacy of tea tree oil in treatment of onychomycosis. **Int. J. Pharmacognosy Phytochem. Res.**, v. 9, 2018. DOI [10.25258/phyto.v9i12.11184](https://doi.org/10.25258/phyto.v9i12.11184). Disponível em: https://www.researchgate.net/publication/323502548_Evaluation_of_the_Therapeutic. Acesso em: 12 jun. 2024.
- AKHTAR, N.; SHARMA, H.; PATHAK, K. Onychomycosis: potential of nail lacquers in transungual delivery of antifungals. **Scientifica (Cairo)**, v. 2016, n. 1387936, 2016. DOI [10.1155/2016/1387936](https://doi.org/10.1155/2016/1387936). Disponível em: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC4829734/>. Acesso em: 12 jun. 2024.
- AMALRAJ, A.; HAPONIUK, J. T.; THOMAS, S.; GOPI, S. Preparation, characterization and antimicrobial activity of polyvinyl alcohol/gum arabic/chitosan composite films incorporated with black pepper essential oil and ginger essential oil. **Int. J. Biol. Macromolec.**, v. 151, p. 366–75, 2020. DOI [10.1016/j.ijbiomac.2020.02.176](https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.02.176). Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0141813019400408?via%3Dihub>. Acesso em: 12 jun. 2024.
- ARAUJO, R. K.; FROTA, V. C.; SANTANA, M. S.; SOUZA, N. R. risco emergente das infecções fúngicas invasivas: revisão da literatura. **Rev. Ibero-Am. Hum., Ciênc. Educ. REASE**, v. 9. n. 8, ago. 2023.
- ARAÚJO, J. G.; SOUZA, M. A. J.; BASTOS, O. M.; OLIVEIRA, J. C. Onychomycosis caused by emergent fungi: clinical analysis, diagnosis and revision. **An. Bras. Dermatol.**, v. 78, p. 445–455, 2003.
- BARROS, C.; LIMA, I.; BUNHAK, É. Filmes poliméricos no manejo de feridas: uma revisão. **Res. Soc. Dev.**, v. 11, n. 6, e10111628757, 2022.
- BARZEGAR, S.; ZARE, M. R.; SHOJAEI, F.; ZARESHAHRABADI, Z.; KOOHI-HOSSEINABADI, O.; SAHARKHIZ, M. J. Coreshell chitosan/PVA-based nanofibrous scaffolds loaded with *Satureja mutica* or *Oliveria decumbens* essential oils as enhanced antimicrobial wound dressing. **Int. J. Pharm.**, v. 597, n. 120288, 2021. DOI [10.1016/j.ijpharm.2021.120288](https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2021.120288). Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378517321000922?via%3Dihub>. Acesso em: 12 jun. 2024.

BASWAN, S.; KASTING, G. B.; LI, S. K.; WICKETT, R.; ADAMS, B.; EURICH, S.; SCHAMPER, R. Understanding the formidable nail barrier: a review of the nail microstructure, composition and diseases. **Mycoses**, v. 60, n. 5, p. 284-295, 2017.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução da Diretoria Colegiada - RDC No 298, de 12 de agosto de 2019. Dispõe sobre a aprovação da Farmacopeia Brasileira, 6ª edição. 2025. Disponível em: https://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/anvisa/2019/rdc0298_12_08_2019.pdf. Acesso em: 10 mar. 2024.

CARSON, C. F.; HAMMER, K. A.; RILEY, T. V. Melaleuca alternifolia (Tea Tree) oil: a review of antimicrobial and other medicinal properties. **Clin. Microbiol. Rev.**, v. 19, n. 1, p. 50–62, jan. 2006.

CORTEZ, I. C.; CUNHA, R. S.; PRUDENCIO, E. R.; LUCHESE, R. H.; FERNANDES, L. D.; OLIVEIRA, R. N. Hidrogéis carregados com óleo essencial de melaleuca: caracterização microestrutural e in vitro. **Rev. Iberoam. Polím.**, v. 22, n. 3, p. 113–122, 2021.

D'AGOSTINO, M.; TESSE, N.; FRIPPIAT, J. P.; MACHOUART, M.; DEBOURGOGNE, A. Óleos essenciais e seus compostos ativos naturais com propriedades antifúngicas. *Molecules*, v. 24, p. 3713, 2019.

DHAMOON, R. K.; POPLI, H.; GUPTA, M. Novel drug delivery strategies for the treatment of onychomycosis. **Pharm. Nanotechnol.**, v. 7, n. 1, p. 24–38, 2019.

DING, C.; ZHANG, M.; GUONYING, L. Preparation and characterization of collagen/hydroxypropyl methylcellulose (HPMC) blend film. **Carbohydrate Polymers**, v. 119, p. 194–201, 2015.

DUARTE JÚNIOR, A. P. Caracterização térmica de nanopartículas de quitosana. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ANÁLISE TÉRMICA E CALORIMETRIA. 7., 25 abr. 2010. **Anais [...]**. São Pedro: [s. n.], 2010. Disponível em: https://www.researchgate.net/publication/267947951_CHARACTERIZACAO_TERMICA_DE_NANOPARTICULAS_DE_QUITOSANA. Acesso em: 3 mar. 2025.

EL FAWALA, G.; HONG, H.; SONG, X.; WU, J.; SUN, M.; HE, S. Fabrication of antimicrobial films based on hydroxyethylcellulose and ZnO for food packaging application. **Food Pack Shelf. Life**, v. 23, p. 100462, 2020.

FALOTICO, J. M.; LIPNER, S. R. Updated perspectives on the diagnosis and management of onychomycosis. *Clin. Cosmet. Invest. Dermatol.*, v. 15, p. 1933, 2022.

FELIPE, L. O. Lactoferrin, chitosan and Melaleuca alternifolia-natural pro-ducts that show promise in candidiasis treatment. **Braz. J. Microbiol.**, v. 49, n. 2, p. 212–219, 2018.

FLORES, F. C. **Sistemas nanoestruturados contendo óleo essencial de *Malaleuca alternifolia***: desenvolvimento de formulações e atividade biológica. 2011. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2011.

FLORES, F. C.; LIMA, J. A.; RIBEIRO, R. F.; ALVES, S. H.; ROLIM, C. M. B.; BECK, R. C. R.; SILVA, C. B. Antifungal activity of nanocapsule suspensions containing tea tree oil on the growth of *Trichophyton rubrum*. **Mycopathologia**, v. 175, n. 3–4, p. 281–286, 2013.

FOTOS, P.; VINCENT, S.; HELLSTEIN, J. Oral candidosis. **Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol. Endod.**, v. 74, p. 41–49, 1992.

GALHARDAS PERUSINHA, C.; ROSADO, C.; LENCASTRE, A. Novos Avanços no Tratamento da Onicomicose. **J. Port. Soc. Dermatol. Venereol.**, v. 77, n. 3, p. 239–243, 2019. DOI [10.29021/spdv.77.3.1104](https://doi.org/10.29021/spdv.77.3.1104). Disponível em: <https://revista.spdv.com.pt/index.php/spdv/article/view/1104>. Acesso em: 13 jun. 2025.

GARCIA, C. C. Desenvolvimento e avaliação da estabilidade físico-química de formulações de sabonete líquido íntimo acrescidas de óleo de *Melaleuca*. **Rev. Bras. Farm.**, v. 90, n. 3, p. 236–240, 2003.

GUPTA, A. K.; SIMPSON, F. C. Routes of drug delivery into the nail apparatus: implications for the efficacy of topical nail solutions in onychomycosis. **J. Dermatol. Treat.**, v. 27, p. 2–4, 2016.

GUPTA, A. K.; STUDHOLME, C. Novel investigational therapies for onychomycosis: an update. **Expert Opin. Investig. Drugs**, v. 25, n. 3, p. 297–305, 2016.

GUPTA, A. K.; PAQUET, M.; SIMPSON, F. C. Therapies for the treatment of onychomycosis. **Clin. Dermatol.**, v. 31, p. 544–554, 2013.

GUPTA, A. K.; RENAUD, H. J.; QUINLAN, E. M.; SHEAR, N. H.; PIGUET, V. The growing problem of antifungal resistance in onychomycosis and other superficial mycoses. **Am. J. Clin. Dermatol.**, v. 22, p. 2, p. 149–157, 2021.

HAMMER, K. A.; CARSON, C. F.; RILEY, T. V. Antifungal effects of *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil and its components on *Candida albicans*, *Candida glabrata* and *Saccharomyces cerevisiae*. **J. Antimicrob. Chemother.**, v. 53, n. 6, p. 1081–1085, 2004.

HAO, J.; SMITH, K. A.; LI, S. K. Time-dependent electrical properties of human nail upon hydration in vivo. **J. Pharm. Sci.**, v. 99, n. 1, p. 107–118, 2010.

HOLT, R. J.; AZMI, A. Miconazole-resistant *Candida*. **Lancet**, v. 1, p. 50–51, 1978.

INTERNATIONAL ORGANISATION FOR STANDARDISATION. **ISO 4730:2004. Oil of *Melaleuca*, terpinen-4-ol type (tea tree oil)**. Geneva: ISO, 2004. Disponível em: http://www.iso.org/iso/iso_catalogue/catalogue_tc/catalogue_detail.htm?csn=37033. Acesso em: 3 mar. 2024.

JINNA, S.; FINCH, J. Spotlight on tavaborole for the treatment of onychomycosis. **Drug Des. Devel. Ther.**, v. 9, p. 6185–6190, 2015.

JULIANO, C.; DEMURTAS, C.; PIU, L. In vitro study on the anticandidal activity of *Melaleuca alternifolia* (tea tree) essential oil combined with chitosan. **Flavour Fragr. J.**, v. 23, n. 4, p. 227–231, 2008. DOI [10.1002/ffj.1871](https://doi.org/10.1002/ffj.1871). Disponível em: <https://doi.org/10.1002/ffj.1871>.

KAUR, R.; KASHYAP, B.; BHALLA, P. Onychomycosis - epidemiology, diagnosis. **Indian J. Med. Microbiol.**, v. 26, p. 108–116, 2008.

KHOSRAVI, A. R.; SHOKRI, H.; SAFFARIAN, Z. Anti-fungal activity of some native essential oils against emerging multi-drug resistant human nondermatophytic moulds. **J. Herbal Med.**, v. 23, p. 100370, 2020.

KHWAZA, V.; ADERIBIGBE, B. A. Antibacterial activity of selected essential oil components and their derivatives: a review. **Antibiotics** v. 14, n. 1, p. 68, 2025.

KWIECIŃSKI, J.; EICK, S.; WÓJCIK, K. Effects of tea tree (*Melaleuca alternifolia*) oil on *Staphylococcus aureus* in biofilms and stationary growth phase. **Int. J. Antimicrob. Agents**, v. 33, n. 4, p. 343–347, 2009.

LACAZ, C. S.; PORTO, E.; MARTINS, J. E. C.; VACCARI, E. M. J.; MELO, M. T. **Tratado de micologia médica Lacaz**. 9. ed. São Paulo: Sarvier, 2002.

LAURENT, A.; MONOD, M. Production of *Trichophyton rubrum* microspores in large quantities and its application to evaluate amorolfine/azole compound interactions in vitro. **Mycoses**, v. 60, n. 9, p. 581–586, 2017.

LEUNG, A. K. C.; LAM, J. M.; LEONG, K. F.; HON, K. L.; BARANKIN, B.; LEUNG, A. A. M.; WONG, A. H. C. Onychomycosis: an updated review. **Recent Patents Inflamm. Allergy Drug Disc.**, v. 14, n. 1, p. 32–45, mar. 2020.

LIPNER, S. R.; SCHER, R. K. Onychomycosis: clinical overview and diagnosis. **J. Am. Acad. Dermatol.**, v. 80, n. 4, p. 835–851, 2019.

LIPNER, S. R.; JOSEPH, W. S.; VLAHOVIC, T. C.; SCHER, R. K.; RICH, P.; GHANNOUM, M.; DANIEL, C. R.; ELEWSKI, B. Therapeutic recommendations for the treatment of toenail onychomycosis in the US. **J. Drugs Dermatol.**, v. 20, n.10, p. 1076–1084, 2021.

LOPES, J. O.; ALVES, S. H.; MARI, C.; OLIVEIRA, L. T. O.; BRUM, L. M.; WESTPHALEN, J. B. A ten-year survey of onychomycosis in the central region of the Rio Grande do Sul, Brazil. **Rev. Inst. Med. Trop.**, v. 41, p. 147–149, 1999.

MARCOS-TEJEDOR, F.; GONZÁLEZ-GARCÍA, P.; MAYORDOMO, R. Solubilization in vitro of tea tree oil and first results of antifungal effect in onychomycosis. **Enferm. Infecc. Microbiol. Clin. (Engl Ed)**, v. 39, n. 8, p. 395–398, 2021.

MARTINEZ-CAMACHO, A. P.; COTA, O.; MORENO, F. A.; CORTEZ-ROCHA, M. O.; CASTILHO-ORTEGA, M. M.; CASTILHO-YANEZ, F. J. Chemical and biological properties of chitosan from shrimp waste: obtention and physical characterization, fungistatic and insect repellent activities. 18 fev. 2007. *In: ANUAL MEETING OF THE PACIFIC FISHERIES TECHNOLOGIST HERMOSILLO, SONORA, 58., 18 fev. 2007. Proceedings [...].* México: [s. n.], 2007.

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

MATICA, M. A.; AACHMANN, F. L.; TØNDERVIK, A.; SLETTA, H.; OSTAFE, V. Chitosan as a wound dressing starting material: Antimicrobial properties and mode of action. **Int. J. Mol. Sci.**, v. 20, n. 23, p. 5889, 2019.

MAUCH, M. I. **Avaliação do efeito da dexametasona em diferentes combinações farmacológicas frente a cepas dermatofíticas de interesse clínico.** 2023. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Faculdade de Farmácia. Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Porto Alegre, 2023.

MINETO, A. R. **Formulação nanotecnológica para o manejo tópico de onicomicoses: pedido de patente, desenvolvimento e validação de método bioanalítico e estudos in vitro de permeação e atividade antifúngica em modelo ungueal.** 2023. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Faculdade de Farmácia. Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Porto Alegre, 2023.

MIRON, D.; BATTISTI, F.; SILVA, F. K.; LANA, A. D.; PIPPI, B.; CASANOVA, B. Antifungal activity and mechanism of action of monoterpenes against dermatophytes and yeasts. **Rev. Bras. Farmacogn.**, v. 24, n. 6, p. 660–667, 2014.

MURDAN, S. Drug delivery to the nail following topical application. **Int. J. Pharm.**, v. 236, n. 1–2, p. 1–26, 2002.

MURDAN, S. Erratum to drug delivery to the nail following, topical application. **Int. J. Pharm.**, v. 392, n. 1–2, p. 314, 2010.

NATU, K. N.; TATKE, P. A. Essential oils - prospective candidates for antifungal treatment? **J. Essential Oil Res.**, v. 31, n. 5, p. 347-360, 2019.

NEPOMOCENO, T. A. R.; PIETROBON JÚNIOR, A. Melaleuca Alternifolia: uma revisão sistemática da literatura brasileira. **Uningá Rev.**, v. 2020, n. 35, p. eRUR3409, 2020. Disponível em: <https://revista.uninga.br/uningareviews/article/view/3409>. Acesso em: 12 jun. 2024.

NOGUEIRAS-NIETO, L.; DELGADO-CHARRO, M. B.; OTERO-SPINAR, F. J. Thermogelling hydrogels of cyclodextrin/poloxamer polypseudorotaxane as aqueous-based nail lacquers, application to the delivery of triamcinolone acetonide and ciclopirox olamine. **Eur. J. Pharm. Biopharm.**, v. 83, n. 3, p. 370–377, 2013.

ODDS, F. C.; BROWN, A. J.; GOW, N. A. Antifungal agents: mechanisms of action. **Trends Microbiol.**, v. 11, p. 272–279, 2003.

OLIVA, B.; PICCIRILLI, E.; CEDDIA, T.; PONTIERI, E.; AURELI, P.; FERRINI, A. M. Antimycotic activity of *Melaleuca alternifolia* essential oil and its major components. **Lett. Appl. Microbiol.**, v. 37, n. 2, p. 185–187, 2003.

RAJENDRA, V. B.; BARO, A.; KUMARI, A.; DHAMECHA, D. L.; LANOTI, S. R.; SHELKE, S. D. Transungual drug delivery an over view. **J. Appl. Pharm. Sci.**, v. 02, n. 01, p. 203–209, 2012.

RAJINIKANTH, B. S.; RAJKUMAR, D. S. R.; KEERTHIKA, K.; VIJAYARAGAVAN, V. **Chitosan**-based biomaterial in wound healing: a review. **Cureus**, v. 16, n. 2, e-55193, 2024.

RODRÍGUEZ-VÁZQUEZ, M.; VEGA-RUIZ, B.; RAMOS-ZÚÑIGA, R.; SALDAÑA-KOPPEL, D. A.; QUIÑONES-OLVERA, L. F. Chitosan and its potential use as a scaffold for tissue engineering in regenerative medicine. **BioMed Res. Int.**, v. 2015, p. 821279, 2015. DOI [10.1155/2015/821279](https://doi.org/10.1155/2015/821279). Disponível em: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC4609393/>. Acesso em: 12 jun. 2024.

SANTOS, V. L. P. dos; SILVA, D. S.; ALBERINI, R. de C.; BERTÉ, R. A utilização de óleos essenciais extraídos de *Melaleuca alternifolia* na podologia para tratamento de onicomicoses: uma revisão. **Braz. J. Dev.**, v. 8, n. 7, p. 54120–54129, 2022.

SHIVAKUMAR, H. N.; JULURI, A.; DESAI, B. G.; MURTHY, S. N. Ungual and transungual drug delivery. **Drug Dev. Ind. Pharm.**, v. 38, n. 8, p. 901–911, 2012.

SILVA, F. T. **A utilização do óleo essencial de *Melaleuca alternifolia* na onicomicose**. 2010. Dissertação (Mestrado) – Universidade do Vale do Itajaí, Santa Catarina, 2010. Disponível em: <http://siaibib01.univali.br/pdf/Fabr%C3%ADcia%20Theodoro%20da%20Silva,%20Sa.> Acesso em: 12 jun. 2024.

SIMÕES, C. M. O.; SPITZER, V. Óleos voláteis. In: SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 5. ed. Porto Alegre: Editora da UFRGS, 2004. p. 467–495.

SMITH, K. A.; HAO, J.; LI, S. K. Influence of pH on transungual passive and iontophoretic transport. **J. Pharm. Sci.**, v. 99, n. 4, p. 1955–1967, 2010.

SONG, G.; ZHANG, M.; LIU, W.; LIANG, G. Epidemiology of onychomycosis in Chinese Mainland: a 30-year retrospective study. **Mycopathologia**, v. 187, n. 4, p. 323–331, 2022.

TRABOULSI, R. S.; MUKHERJEE, P. K.; GHANNOUM, M. In vitro activity of inexpensive topical alternatives against *Candida* spp. isolated from the oral cavity of HIV-infected patients. **Int. J. Antimicrob. Agents**, v. 31, n. 3, p. 272–276, 2008.

TUNNEY, J. J.; DETELLIER, C. Preparation and characterization of two distinct ethylene glycol derivatives of kaolinite. **Clays Clay Minerals**, v. 42, n. 5, p. 552–560, 1994. .

VILLAR RODRÍGUEZ, J.; PÉREZ PICO, A. M.; MINGORANCE ÁLVAREZ, E.; MAYORDOMO ACEVEDO, R. Meta-análise das atividades antifúngicas de três óleos essenciais como terapias alternativas em infecções por dermatofitose. *J. Appl. Microbiol.*, v. 133:241–253, 2022.

VÖRÖS-HORVÁTH, B.; DAS, S.; SALEM, A.; NAGY, S.; BÖSZÖRMÉNYI, A.; KŐSZEI, T.; PÁL, S.; SZÉCHENYI, A. Formulation of tioconazole and melaleuca alternifolia essential oil pickering emulsions for onychomycosis topical treatment. **Molecules**, v. 25, n. 23, p. 5544, 2020.

WILKINSON, J. M.; CAVANAGH, H. M. Antibacterial activity of essential oils from Australian native plants. **Phytother. Res.**, v. 19, n. 7, p. 643–646, 2005.

WILLIAMS, L. P. Antimicrobial activity of oil lealeuca (tea tree oil). Its potential use in cosmetics and toiletries. **Cosmet. Aerosol Toil. Austr.**, v. 4, n. 4, p. 12-22, 1990.

WINKELMAN, W. J. Aromatherapy, botanicals, and essential oils in acne. **Clin. Dermatol.**, v. 36, n. 3, 299-305, 2018.

YU, D.; WANG, J.; SHAO, X.; XU, F.; WANG, H. Antifungal modes of action of tea tree oil and its two characteristic components against *Botrytis cinerea*. *J. Appl. Microbiol.*, v. 119, p. 1253–1262, 2015.

ZUPANC, A.; PETKOVŠEK, M.; ZDOVC, B.; ŽAGAR, E.; ZUPANC, M. Degradation of hydroxypropyl methylcellulose (HPMC) by acoustic and hydrodynamic cavitation. **Ultrason. Sonochem.**, v. 109, n. 107020, 2024. DOI [10.1016/j.ultsonch.2024.107020](https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2024.107020). Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1350417724002682>. Acesso em: 12 jun. 2024.

ANEXO A – CERTIFICADO DE ANALISE OLEO ESSENCIAL MELALEUCA



CERTIFICATE OF ANALYSIS

100% Pure Australian Tea Tree Oil
(*Melaleuca alternifolia*)

Our commitment
to quality products
and services



Lab Results Received Date: June 2019
Batch No: MA01002MPB
Scientific Name: *Melaleuca alternifolia*
Country of Origin: 100% Australian
Extraction Method: Steam distilled (water)
INCI: Melaleuca Alternifolia (Tea Tree) Leaf Oil
Appearance: Clear, colorless to yellow mobile liquid
Odor: Warm, spicy, earthy, Characteristic

Physical Analysis:

COMPONENT	RESULT	TEST METHOD
Specific Gravity	0.892	Ph.Eur.2.2.5
Refractive Index	1.4774	Ph.Eur.2.2.6
Optical Rotation	9.77	Ph.Eur.2.2.7

Major Chemical Constituents:

COMPONENT	RESULTS	TEST METHOD
	Area %	
α-Pinene	2.31	ARL-TM101-3
Sabinene	0.77	ARL-TM101-3
α-Terpinene	10.04	ARL-TM101-3
Limonene	0.89	ARL-TM101-3
p-cymene	2.25	ARL-TM101-3
1,8 Cineole	2.32	ARL-TM101-3
γ-Terpinene	20.18	ARL-TM101-3
α-Terpinolene	3.54	ARL-TM101-3
Terpinen-4-ol	39.65	ARL-TM101-3
α-Terpineol	2.81	ARL-TM101-3
Aromadendrene	1.34	ARL-TM101-3
Ledene	1.08	ARL-TM101-3
δ-Cadinene	1.26	ARL-TM101-3
Globulol	0.25	ARL-TM101-3
Viridiflorol	0.18	ARL-TM101-3

Down Under Enterprises International Pty Ltd
19A Boundary Street
Darlinghurst, NSW 2010, Australia
Australia Phone: +61 2 9539 7801

info@DownUnderEnterprises.com
www.DownUnderEnterprises.com
VERSION 3

Down Under Enterprises, Inc.
17820 Englewood Dr. Unit 14
Cleveland, OH 44130 USA
US Toll Free: +1 866 473 6560

ANEXO B – LISTA DE ALERGÊNICO



ALLERGENS STATEMENT

Fragrance Trade Name: 100% Pure Australian Tea Tree Oil
(Melaleuca alternifolia)

INCI Name: Melaleuca Alternifolia (Tea Tree) Leaf Oil

CAS #: 85085-48-9 and 68647-73-4

We confirm that the 100% Pure Australian Tea Tree Oil supplied by Down Under Enterprises International Pty. Ltd. contains 1 of the 26 allergen ingredients as defined in the Cosmetics Products Regulation (EC) 1223/2009:

Ingredient	CAS#	Direct %	Natural %	Total %
Amyl cinnamal	122-40-7	0.0%	0.0%	0.0%
Benzyl alcohol	100-51-6	0.0%	0.0%	0.0%
Cinnamyl alcohol	104-54-1	0.0%	0.0%	0.0%
Citral	5392-40-5	0.0%	0.0%	0.0%
Eugenol	97-53-0	0.0%	0.0%	0.0%
Hydroxy-citronellal	107-75-5	0.0%	0.0%	0.0%
Isoeugenol	97-54-1	0.0%	0.0%	0.0%
Amylcinnamyl alcohol	101-85-9	0.0%	0.0%	0.0%
Benzyl salicylate	118-58-1	0.0%	0.0%	0.0%
Cinnamal	104-55-2	0.0%	0.0%	0.0%
Coumarin	91-64-5	0.0%	0.0%	0.0%
Geraniol	106-24-1	0.0%	0.0%	0.0%
Hydroxy-methylpentylcyclohexenecarboxaldehyd	31906-04-4	0.0%	0.0%	0.0%
Anisyl alcohol	105-13-5	0.0%	0.0%	0.0%
Benzyl cinnamate	103-41-3	0.0%	0.0%	0.0%
Farnesol	4602-84-0	0.0%	0.0%	0.0%
Propionald-hyd	80-54-6	0.0%	0.0%	0.0%
Linalool	78-70-6	0.0%	0.0%	0.0%
Benzyl benzoate	120-51-4	0.0%	0.0%	0.0%
Citronellol	106-22-9	0.0%	0.0%	0.0%
Hexyl cinnam-aldehyd	101-86-0	0.0%	0.0%	0.0%
d-Limonene	5989-27-5	0.0%	0.5% - 1.5%	0.5% - 1.5%
Methyl heptin carbonate	111-12-6	0.0%	0.0%	0.0%
Alpha-isomethyl ionone	127-51-5	0.0%	0.0%	0.0%
Oak moss and treemoss extract	90028-68-5	0.0%	0.0%	0.0%
Treemoss extract	90028-67-4	0.0%	0.0%	0.0%

Name: 
 Matthew Rafter
 Title: Logistics & QA Coordinator
 Date: January 2020

Down Under Enterprises International Pty Ltd
 19A Boundary Street
 Darlinghurst, NSW 2010, Australia
 Australia Phone: +61 2 9539 7801

info@DownUnderEnterprises.com
www.DownUnderEnterprises.com
VERSION 3

Down Under Enterprises, Inc.
 17820 Englewood Dr. Unit 14
 Cleveland, OH 44130 USA
 US Toll Free: +1 866 473 6560

ANEXO C – CERTIFICADO ANÁLISE HIDROXIPROPILMETILCELULOSE

SM
Empreendimentos Farmacêuticos

CERTIFICADO DE ANÁLISE

6126 10 kg

Insumo:	Hpmc(Hidroxipropilmetilcel)		
Lote Interno:	24F17-B008-200274	Lote do Fabricante:	20221143
Data de Fabricação:	26/11/2022	Data de Vencimento:	25/11/2025
Origem:	China	Procedência:	Hong Kong
Data da Análise:	18/07/2024	Número da Ordem:	200274
Condições de Armazenamento:	Temperatura Ambiente - Manter ao Abrigo da Luz		

CAS:	9004-65-3	DCB:	04736	DCI:	HYPROMELLOSE
Fórmula Molecular:	C3H8O2.xCH4O.x	Peso Molecular:	318,233		

Testes	Especificações	Resultados	Unidade	Referência
Descrição*	Pó granular ou fibroso, branco a ligeiramente esbranquiçado.	Conforme		USPNF 2024
Solubilidade*	Insolúvel em álcool desidratado, em éter e em clorofórmio; Intumesce em água e produz uma mistura coloidal viscosa clara a opalescente.	Conforme		USPNF 2024
Identificação*	A: O material em pó agrega-se à superfície.	Conforme		USPNF 2024
Identificação*	B: O líquido resultante é uma solução límpida ou ligeiramente turva com espessura dependente do grau de viscosidade.	Conforme		USPNF 2024
Identificação*	C: Inicialmente desenvolve-se uma cor vermelha que muda para roxo em 100 minutos.	Conforme		USPNF 2024
Identificação*	D: Um filme firme e claro se forma na lâmina de vidro.	Conforme		USPNF 2024
Identificação*	E: A temperatura de floculação é superior a 50°C.	Conforme		USPNF 2024
Perda por dessecação*	<= 5,0% (1g/ 105°C/ 1 hora)	2,0100	%	USPNF 2024
Resíduo por ignição	<= 1,5	0,7000	%	USPNF 2024
pH (10%)*	5,8 - 8,0 (Solução 2%)	6,31		USPNF 2024
Viscosidade	4,0 - 6,0	4,7000	mPa.s	USPNF 2024
Hidroxipropoxi (CG)	7,0 - 12%	8,8000	%	USPNF 2024
Metóxi (CG)	28,0 - 30,0%	29,2000	%	USPNF 2024
Testes microbiológicos		-		
Contagem total de bactérias*	<= 1000	< 10	ufc/g	Fabricante
Fungos e leveduras*	<= 100	< 10	ufc/g	Fabricante
Escherichia coli*	Negativo	Negativo		Fabricante
Testes adicionais		-		
Densidade aparente*	Informativo (Sem compactação)	0,72	g/mL	MG FB - VI
Atividade de água*	<= 0,6	0,4394	aw	MG-FQ/149

* Resultados obtidos em análises realizadas no laboratório de Controle de Qualidade SM EMPREENDIMENTOS FARMACÊUTICOS LTDA. Os demais foram transcritos conforme certificado de análise do fabricante.

Conclusão APROVADO


Farmacêutico Responsável
João Paulo Sartin Mendes
CRF-GO: Nº 7.355
Fagron Services Brasil


Farmacêutico Responsável
Amanda R. Victorino
CRF-SP: Nº 50.836
Fagron Distribution Brazil
SAC: (11) 5186-4840

ANEXO D – CERTIFICADO DE ANÁLISE POLIETILENOGLICOL

SM EMPREENDIMENTOS FARMACÊUTICOS LTDA



CERTIFICADO DE ANÁLISE

51585 2kg

Insumo:	Polietilenoglicol 400	Lote Fabricante:	TQ-950-26038469W231119
Lote Interno:	24D16-B016-207201	Data de Validade:	18-11-2025
Data de Fabricação:	19-11-2023	Procedência:	Brasil
Origem:	Brasil	Ordem de Fracionamento:	207201
Data de Análise:	26-04-2024		
Condições de Armazenamento:	Temperatura Ambiente		

DCB:	05474	DCI:	MACROGOL
CAS:	25322-68-3	Peso Molecular:	-
Fórmula Molecular:	(C ₂ H ₄ O) _x H ₂ O		
	-		
	-		

Testes	Especificações	Resultados	Unidade	Referências
Descrição *	Líquido viscoso, transparente a ligeiramente turvo, incolor ou praticamente incolor,			
	ligeiramente higroscópico, com um leve odor característico.	Conforme		USPNF - 2023
Densidade relativa *	Em torno de 1,12	1,10	g/mL	USPNF - 2023
Resíduo por ignição	<= 0,1	0,1	%	USPNF - 2023
Limite (CG)	Óxido de etileno livre <= 10	1	µg/g	USPNF - 2023
Limite (CG)	1,4-Dioxano <= 10	1	µg/g	USPNF - 2023
Limite (UV)	Limite de etilenoglicol (monoetilenoglicol) e dietilenoglicol <= 0,25	0,18	%	USPNF - 2023
pH *	4,5 - 7,5 (Solução 5%)	6,22		USPNF - 2023
Viscosidade	6,8 - 8,0	7,5	cSt	USPNF - 2023
Compleitude e cor da solução	A solução é incolor e límpida.	Conforme		USPNF - 2023
Peso molecular médio	380 - 420	405	g/mol	USPNF - 2023
Testes adicionais				
Índice de hidroxila	267 - 295	277	mg KOH/g	Fabricante
Índice de acidez	<= 0,5	0,0	mg KOH/g	Fabricante
Umidade	<= 0,2	0,1	%	Fabricante

* Resultados obtidos em análises realizadas no Laboratório de Controle de Qualidade SM EMPREENDIMENTOS FARMACÊUTICOS LTDA. E os demais foram transcritos conforme certificado de análise do fabricante.

Conclusão:

Aprovado (X)
Reprovado ()

ANEXO E – CERTIFICADO DE ANÁLISE PROPILENOGLICOL

SM
Empreendimentos Farmacêuticos

CERTIFICADO DE ANÁLISE

51585 2 kg

Insumo:	Propilenoglicol - Usp	Lote do Fabricante:	KH8053PU2D
Lote Interno:	24L10-B002-205829	Data de Vencimento:	04/08/2026
Data de Fabricação:	05/08/2024	Procedência:	Brasil
Origem:	Coreia Do Sul	Número da Ordem:	205829
Data da Análise:	10/01/2025		
Condições de Armazenamento:	Temperatura Ambiente - Manter ao Abrigo da Luz		

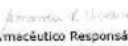
CAS:	57-55-6	DCB:	07455	DCI:	-
Fórmula Molecular:	C3H8O2	Peso Molecular:	76,0942		

Testes	Especificações	Resultados	Unidade	Referência
Descrição*	Líquido viscoso, límpido, incolor, praticamente inodoro.	Conforme		USPNF 2024
Solubilidade*	Miscível com água, acetona e clorofórmio; Solúvel em éter; Imiscível em óleos fixos.	Conforme		USPNF 2024
Identificação*	A: IV - O espectro da amostra está de acordo com o do padrão.	Conforme		USPNF 2024
Identificação	C: CG - O tempo de retenção do pico de propilenoglicol na amostra corresponde ao padrão.	Conforme		USPNF 2024
Umidade*	<= 0,2	0,1900	%	USPNF 2024
Resíduo por ignição*	<= 3,5	1,70	mg	USPNF 2024
Cloreto*	<= 70	< 70	ppm	USPNF 2024
Sulfato*	<= 60	< 60	ppm	USPNF 2024
Acidez*	Não mais que 0,20 de NaOH 0,1N é requerido.	0,1	ml	USPNF 2024
Densidade relativa*	1,035 - 1,037	1,036	g/mL	USPNF 2024
Testes adicionais		-		
Ferro	<= 0,1	0,02	ppm	Fabricante
Cor (APHA)	<= 10	2,0000	APHA	Fabricante
IBP	>= 186	186,2000	DegC	Fabricante
DP	<= 189	187,4000	DegC	Fabricante
EG	<= 0,0015	0,0000	%	Fabricante
DEG	<= 0,0015	0,0000	%	Fabricante
Teor	>= 99,8	99,99	%	Fabricante
Impureza Elementar	<= 1	< 1,0	ppm	Fabricante

* Resultados obtidos em análises realizadas no laboratório de Controle de Qualidade SM EMPREENDIMENTOS FARMACÊUTICOS LTDA. Os demais foram transcritos conforme certificado de análise do fabricante.

Conclusão APROVADO


Farmacêutico Responsável
João Paulo Sartim Mendes
CRF-GO: Nº 7.355
Fagron Services Brasil


Farmacêutico Responsável
Amanda R. Victorino
CRF-SP: Nº 50.836
Fagron Distribution Brazil
SAC: (11) 5186-4840

ANEXO F – CERTIFICADO DE ANÁLISE ALCOOL ISOPROPILICO

50489. 2 litros

DEPARTAMENTO DE CONTROLE DE QUALIDADE		FAB.: 13/08/2024
BOLETIM TÉCNICO		VAL.: 13/08/2025
Cliente PEDIDO 1066114 PHITO FORMULAS - NUCLEO DE PESQUISA FARMACEUT		Origem : SYNTH
PRODUTO ALCOOL ISOPROPILICO U.S.P. 35		Lote Fabricante : -----
LOTE 272762	FÓRMULA C_3H_8O	P.M. 60,10
		CHAVE AUTENTICIDADE YZDAY-ABZQN-FICAL-AERZZ

TESTES	LIMITES	RESULTADOS
01 CARACTERÍSTICAS	liq.limpido, incolor, odor próprio	De acordo
02 IDENTIFICAÇÃO	Positiva	Positiva
03 ACIDEZ	Passa o teste	P.T.
04 DENSIDADE / 25°C	0,783 - 0,787	0,7831
05 INDICE REFRAÇÃO / 20°C	1,376 - 1,378	1,3780
06 RESÍDUO DE EVAPORAÇÃO	máx. 0,005%	0,0006%
07 TEOR (C.G.)	min. 99,0%	99,97%

DATA EMISSÃO	ANALISTA	RESPONSÁVEL	RESULTADO
07/10/2024	AMANDA	IZILDA MORELLI - CRF/SP 9371	APROVADO

CERTIFICADO EMITIDO VIA SISTEMA INTEGRADO COM APROVAÇÃO ELETRÔNICA

Página 01 de 01

LABSYNTH PRODUTOS PARA LABORATÓRIO LTDA

Av. Doutor Ulysses Guimarães, 3857 - Vila Nogueira - Diadema - SP - CEP 09995-080 - Tel (11)4072-6100 - Fax - C.N.P.J. 51462471000152 - I.E.280056465111

www.labsynth.com.br

E-mail: vendas@labsynth.com.br

ANEXO G – SENSIFUNGIDISC – DISCOS DE SENSIBILIDADE FÚNGICA PARA ANTIFUNGIGRAMA

CECON. INSTRUÇÕES DE USO Sensifungidisc

1- Sensifungidisc - Cecon

Discos de sensibilidade fúngica para antifungigrama.

2- Finalidade
O método da difusão em agar através de discos impregnados com antifúngicos é empregado no laboratório para dar ao médico uma orientação terapêutica "in vitro".

3- Descrição do princípio de ação.
O antifungigrama segue o método de Kirby Bauer modificado. Basicamente são discos de papel O impregnados com antifúngicos e que são aplicados sobre superfícies de agar inoculadas com os microorganismos. Estas placas são incubadas em estufa permitindo a difusão do antifúngico inibindo ou não o crescimento.

4- Relação dos componentes e apresentação.
Frasco com sílica gel (desumidificante e detector de umidade), espuma, rolha butílica reversível (para dificultar a entrada de ar e umidade) e 20 discos de papel (diâmetro 6,35 mm) impregnados com antifúngicos na concentração especificada.

5 FC	5 - Fluorocitosina	1 mcg	CTR	Clotrimazol	50 mcg
5 FC	5 - Fluorocitosina	10 mcg	MCZ	Miconazol	50 mcg
AB	Amfotericina B	100 mcg	KET	Ketoconazol	50 mcg
NY	Nistatina	100 U.I.	FLU	Fluconazol	25 mcg
EC	Econazol	50 mcg	ICZ	Itraconazol	10 mcg

5- Relação de materiais para a realização do teste não fornecidos.

- Meios de cultura: YMA, Casitone Complexo, Agar Sabouraud e outros.
- Placas de Petri, tubos de ensaio, swabs, pipetas, solução fisiológica, todos estéreis.
- Pinça, alça de platina e bico de Bunsen.
- Tubo 0,5 da escala de Mac Farland para acerto da turbidez.
- Estufa de cultura a 35 - 37° C.
- Régua ou paquímetro.

6- Condições de armazenamento e transporte.
Os frascos em uso deverão ser armazenados em geladeira.
Os frascos em estoque deverão ser armazenados em freezer.
O transporte deverá ser feito em caixa de isopor sem a necessidade de gelo.
Após a primeira abertura dos frascos, se não for feito vácuo, consumir os discos num prazo máximo de 30 dias, mantidos em geladeira.

7- Descrição das precauções e cuidados no manuseio do produto.

- Somente para uso diagnóstico "in vitro".
- Não comer, beber ou fumar na área onde vai ser realizado o teste.
- Usar luvas e avental quando for manusear o produto.
- Lavar as mãos antes e após o manuseio do produto.
- Não pipetar com a boca.
- Evitar contaminação microbiana dos reagentes quando utilizar os produtos.
- Usar pipetas esterilizadas e pipetas com filtros.
- Trabalhar sempre próximo ao bico de Bunsen.
- Não usar o produto com a data de validade vencida.
- Este produto deverá ser usado somente por técnico supervisionado por microbiologista qualificado ou pelo próprio.
- Autoclavar a 121°C por trinta minutos todo o material contaminado usado no teste e somente depois descartar.
- Para a limpeza e desinfecção do local de trabalho utilizar qualquer solução bactericida: álcool etílico ou isopropílico a 65 - 85%, compostos quaternários de amônio, fenol a 0,5 - 5,0%, etc.

8- Orientação e cuidado com a amostra biológica.

- A amostra biológica poderá ser muito variada, desde raspado de pele, escamas, pêlo, pus de lesões ulceradas, biópsia de pólipos, fluidos aspirados, escarro, sangue, lavados brônquicos, LCR, etc.
- Tanto para a coleta como para o manuseio desses materiais deverá ser obrigatório o uso de luvas e trabalhar com o máximo de cuidado possível.
- Materiais biológicos e lâminas utilizados no exame deverão ser esterilizados antes do descarte.
- Materiais descartáveis deverão ser desprezados na coleta de lixo especial.

9- Metodologia

9.1 Para o antifungigrama
Pegar uma cultura de 24h. (*) do fungo em estudo, em Sabouraud com cloranfenicol. Retirar uma alçada calibrada e adicionar a 10mL de água destilada estéril; teremos aí uma suspensão com 10⁶ UFC por mL.
Pode-se confirmar a concentração através da contagem ou ajustando a turbidez comparando com o tubo 0,5 da escala de Mac Farland.
Preparar uma nova diluição a partir desta a fim de obter uma suspensão 10⁵ UFC/mL, dependendo da levedura (*).
Semear a levedura em placas 15 x 90 mm com 20 mL do meio casitone complexo ou MHA comum ou MHA micológico (para facilitar a interpretação) ou YMA (**).
A semeadura pode ser feita de duas maneiras:
a) Por esfregão: utilizar o inóculo já acertado e com um swab estéril semear a placa toda. Proceder como no Antibiógrama.
b) Por inundação: pipetar 5 mL da solução do inóculo já acertada e verter na placa; o excesso deverá ser retirado com pipeta Pasteur estéril.

Deixar a placa com o inóculo em repouso por 15 minutos.
Colocar os discos de antifúngicos pressionando-os levemente sendo no máximo três discos por placa, deixando as placas por 30 minutos à temperatura ambiente para a pré-difusão.
A seguir invertem-se as placas que vão para a estufa (*).
Os halos de inibição são lidos com régua ou paquímetro e os resultados deverão ser comparados com os da tabela II.

(*) - TABELA I

Fungo	INÓCULO		INCUBAÇÃO	
	Cultura	Suspensão	Temperatura	Tempo
Candida sp	24h	10 ⁵ UFC/mL	37°C	24h
Torulopsis sp	24h	10 ⁵ UFC/mL	37°C	24h
Cryptococcus sp	48h	10 ⁶ UFC/mL	Ambiente	48h
Aspergillus sp	Esporuladas de 5 dias	10 ⁶ UFC/mL	37°C	24h

(**) - O meio Casitone Complexo é utilizado para testar os imidazóis e polienos.
O meio MHA micológico tem em sua composição o azul de metileno e glicose e serve para testar os imidazóis e polienos.
O meio YMA é utilizado para testar os 5-FC (5 Fluorocitosina).

TABELA II

Antifúngico	Símbolo	Conc./ Disco	Zona de Inibição (mm)	CIM mcg/mL	Interpretação
5-Fluorocitosina	5 FC 1	1 mcg	> 20 20 - 10 < 10	< 1,56 1,56 - 25 > 25	Sensível Intermediário Resistente
Anfotericina B	AB	100 mcg	> 10 ≤ 10	< 1 ≥ 1	Sensível Intermediário ou Resistente
Nistatina	NY	100 U.I.	> 10 -- ≤ 10	-- -- --	Sensível -- Resistente
Econazol	EC	50 mcg	> 20 20 - 10 ≤ 10	< 1,56 1,56 - 6,4 > 6,4	Sensível Intermediário Resistente
Clotrimazol	CTR	50 mcg	> 20 20 - 10 ≤ 10	< 1,56 1,56 - 6,4 > 6,4	Sensível Intermediário Resistente
Miconazol	MCZ	50 mcg	> 20 20 - 10 ≤ 10	< 1,56 1,56 - 6,4 > 6,4	Sensível Intermediário Resistente
Ketoconazol	KET	50 mcg	> 20 20 - 10 ≤ 10	< 1,56 1,56 - 6,4 > 6,4	Sensível Intermediário Resistente
Fluconazol	FLU	25 mcg	≥ 19 18 - 15 ≤ 14	≤ 8 32-16 ≥ 64	Sensível Intermediário Resistente
Itraconazol	ICZ	10 mcg	≥ 20 19 - 12 ≤ 11	-- -- --	Sensível Intermediário Resistente

Para *Aspergillus fumigatus*

5-Fluorocitosina	5 FC 1	1 mcg	> 10 -- ≤ 10	-- -- --	Sensível Intermediário ou Resistente
5-Fluorocitosina	5 FC 10	10 mcg	> 10 ≤ 10	-- --	Sensível ou Intermediário Resistente

NOTAS:

- É muito importante utilizar o inóculo e o meio de cultura corretos.
- Podem ocorrer duas zonas de inibição com os derivados imidazólicos; uma grande zona e uma menor onde poderão crescer algumas colônias; estas deverão ser avaliadas posteriormente com novas determinações do CIM.
- Para as cepas consideradas resistentes (diâmetro < 10mm) recomenda-se efetuar a determinação do CIM.
- As colônias encontradas dentro do halo de inibição da 5 FC pertencem às cepas resistentes, que normalmente quando forem replicadas e novamente em contato com o antifúngico deverão confirmar a resistência.

9.1.1 Controle de Qualidade

9.1.1.1 Aspecto Visual

Observar a cor da sílica gel que deverá estar azul.

9.1.1.2 Teste microbiológico

Seguir a metodologia para o antibiograma utilizando algumas cepas padrões tais como: *Aspergillus fumigatus*, *Candida albicans*, *Candida parapsilosis*, *Candida tropicalis*, *Candida glabrata*, *Cryptococcus neoformans*, *Rhodotorula rubra*, *Trichosporum beigelli*, etc...

9.1.1.3 Resultados

Após a incubação das placas inoculadas e com os discos, proceder a leitura dos tamanhos dos halos de inibição e compará-los com os da tabela.

10- Descrição das características de desempenho do produto

O método de Kirby Bauer utilizando os discos de antifúngicos é perfeitamente reprodutível desde que a metodologia seja seguida corretamente.

11- Referências bibliográficas.

- Bauer, A. W., Kirby, W. M. M., Sherris, J. C. and Turck, M. - Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disc method. Amer. J. Clin. Path. 45:493-6, 1966.
- Drouhet E. et Dupont B. "Traitements Antifongiques". Encyclopedie médico-chirurgicale (Paris) 1976, 9. Mal Infect. 800-1 M¹⁰.
- Drouhet E. et Dupont B. "Antibiogramme des Champignons aux Antifongiques". Bull. Soc. Fr. Mycol. Méd. 1978, 7, 165-170.
- Drouhet E. et col., "Standardisation de l'antibiogramme antifongique". Rapport du Groupe d'études de la Société Française de Mycologie Médicale, Bull. Soc. Fr. Mycol. Méd., 1981, 10, 131 - 134.
- O. Vermorel, B. Le Beau, et cols. "Antifongogramme: interpretation et choix d'une technique". VII Journées Nationales de la Société Française de Biologie Clinique. Deauville, 28-30 juin 1988.
- Barry, Arthur L., Brown, Steven D. - "Fluconazole disk diffusion procedure for determining susceptibility of *Candida* species". J. Clin. Microbiology, sept. 1996, p. 2154-2157.
- Talarico, C., Pappalardo, M.C.S.M., Melhem, M.S.C. - "Susceptibilidade a Antifúngicos: Discos para Difusão em Agar" - 1º Congresso de Infectologia do Cone-Sul - São Paulo - Outubro 1998.
- CLSI - Method for antifungal disk diffusion susceptibility testing of yeasts - M44 - P. 2009.
- CLSI M44-E13-2018 Method for Antifungal Disk Diffusion Susceptibility Testing of Yeasts, 3rd Edition.

Somente para uso diagnóstico "in vitro"

Serviço de Atendimento ao Cliente - SAC
Fone (011) 3743-6348

Farmacêutica Responsável: Dra. Ana Paula Cotrim - CRF- SP 23426.

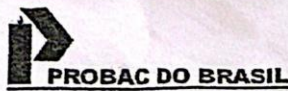
Registro no M.S. nº 1000600106

Fabricado e Distribuído por:
CECON-Centro de Controle e Produtos para Diagnósticos Ltda.
Rua Maranguape, 84 - Cep 05625-150 Vila Sônia - SP
Indústria Brasileira - CNP
J nº 46.273.637/0001-52
Fone: 3743-6211 - Fax: 3743-4394
e-mail: cecon@ceconsp.com.br

Nº do lote, fabricação e prazo de validade: veja frasco

Revisão 03 DEZ 22

ANEXO H- ESCALA NEFELOMÉTRICA DE MC FARLAND



ESCALA NEFELOMÉTRICA DE MC FARLAND

NEFELOBAC

Indicações:

A escala nefelométrica de Mc Farland é o padrão de turvação mais frequentemente utilizado nos laboratórios de microbiologia, para determinar a intensidade da multiplicação em meios de cultivo líquidos.

Esta multiplicação se manifesta nos meios líquidos por um aumento das partículas (bactérias) que se opõem a livre passagem da luz, provocando turvação ou opacidade no meio. Quanto maior o número de bactérias, maior será a opacidade do meio de cultura.

Característica dos componentes:

O NEFELOBAC é preparado de acordo com a fórmula nefelométrica de Mc Farland. Consiste em uma série de 11 tubos numerados de 0,5 a 10, com diferentes quantidades de cloreto de bário e ácido sulfúrico para se obter diferentes concentrações de sulfato de bário, que correspondem a diferentes contagens bacteriana. A equivalência destas contagens está expressa na tabela abaixo:

Tubo nº	0,5	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Nº aprox. bac (x 10 ⁶)	1,5	3	6	9	12	15	18	21	24	27	30

Assim o tubo nº 5 corresponde a 150 milhões de bactérias por mL de meio e o tubo nº 10 corresponde a 3 bilhões de bactérias por mL de meio.

Procedimento:

Comparar a olho nu os tubos de NEFELOBAC com o tubo de cultura bacteriana. Antes, agitar vigorosamente os tubos do NEFELOBAC, pois em repouso o sulfato de bário tende a precipitar. Também homogeneizar o tubo com a cultura bacteriana, para ter uma suspensão (turvação) uniforme.

Recomendamos fazer as leituras comparativas dos tubos, colocando-os contra um texto impresso, de forma que a maior ou menor claridade das letras vistas através dos tubos indique maior ou menor turvação.

Observação: Não romper o lacre, abrir o frasco ou transferir para outro recipiente, pois tal prática não assegura transferência e manutenção da correta concentração de sulfato de bário.

Precauções: Após a validade deve ser descartado conforme as recomendações vigentes para resíduos de serviços de saúde.

Apresentação: Caixa com 11 frascos.

Conservação: Manter o produto em temperatura ambiente (10°C-30°C).

Validade: 12 meses.

Referências Bibliográficas:

1. Lennette, EH; Balows, A.; Hausler, WJ; Shadomy, HJ – Manual of Clinical Microbiology. American Society for Microbiology, Washington, D.C., 1985.

SOMENTE PARA USO DIAGNÓSTICO "IN VITRO" Rev.: 01

PROBAC DO BRASIL Produtos Bacteriológicos Ltda.
Rua Jaguaribe, 35 – Sta. Cecília - São Paulo – SP - CEP: 01224-001
Fone: 55 11 3367-4777 - Fax: 55 11 3223-8368
CNPJ 45.597.176/0001-00 - Insc. Est. 110.485.842.111
Site: www.probacbrasil.com E-mail: probac@probac.com.br