

Sandra Teresa de Oliveira Mendes

Desenvolvimento de formas farmacêuticas de ação tópica com potencial antifúngico derivadas da cortiça

Dissertação de Mestrado em Biotecnologia Farmacêutica, orientada pelo Professor Doutor João José Sousa e pela Professora Doutora Maria Eugénia Pina e apresentada na Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra

Setembro de 2013



UNIVERSIDADE DE COIMBRA

Solicitação de Confidencialidade

Estando o presente trabalho em fase de preparação de patente, solicita-se a todos os envolvidos o dever de sigilo de conteúdo.

No seguimento da atividade diária da Corticeira Amorim, do Grupo Amorim, sediado a Norte do País, surgiu a oportunidade da utilização de extratos derivados de granulado de cortiça, em novas formas farmacêuticas com potencial ação antifúngica. Neste sentido, foi realizado um screening inicial, do qual se obtiveram os compostos com potencial ação antifúngica (primeira parte), seguido da sua formulação em produtos de ação tópica (segunda parte).

Este trabalho, inserido num projeto QREN (Quadro de Referência Estratégica Nacional), da Agência de Inovação, em co-promoção com a Universidade de Coimbra, liderado pela Professora Doutora Maria Teresa Batista, realizou-se inicialmente no Laboratório de Farmacognosia da Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra (primeira parte) e depois no Laboratório de Tecnologia Farmacêutica da mesma Faculdade (segunda parte).



Trabalho financeiramente suportado pelo projeto 5455 – BioactiveCork, QREN – Projectos de I&DT Empresas em Co-Promoção, no âmbito do Programa Operacional de Fatores de Competitividade (COMPETE)



À minha Mãe

e

Ao João Pedro

Agradecimentos

À Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra, onde foi realizado o presente trabalho e sem a qual não teria sido possível a sua concretização, instituição onde iniciei e continuo o meu percurso académico, que sempre me acolheu.

A todas as entidades envolvidas que me deram a oportunidade de realizar este trabalho.

Ao Professor Doutor João José que logo se mostrou disponível para me orientar neste trabalho experimental e que acreditou que seria possível de desenvolver. Obrigada pela força e encorajamento nos momentos mais difíceis.

À Professora Doutora Maria Eugénia Pina pelo incentivo e disponibilidade, e pela forma como me acolheu.

À Professora Doutora Maria Teresa Batista pela disponibilidade e carinho.

À D. Gina pelo apoio incondicional nas várias etapas do desenvolvimento do trabalho no Laboratório de Tecnologia Farmacêutica e a todos os membros e colegas de laboratório pelo companheirismo e amizade.

Aos meus colegas de mestrado, Diogo e Tânia, pela ajuda nas maiores dificuldades e aos restantes colegas pelo companheirismo e camaradagem.

À minha Mãe, a força que me move para realizar os meus sonhos, pelo encorajamento nos momentos mais difíceis.

Ao meu Pai e família que sempre acreditaram em mim.

Ao João Pedro, meu marido, pelo companheirismo e dedicação, sem o qual a realização deste trabalho não seria possível.

Glossário

API: *Active Pharmaceutical Ingredient*

DNA/ADN: Ácido Desoxirribonucleico

HIV: Vírus da Imunodeficiência Humana

HPV: Vírus do Papiloma Humano

ICH: *International Conference on Harmonization*

OM: Onicomicose

PCR: Reação em Cadeia da Polimerase

RMN: Ressonância Magnética Nuclear

Índice de Figuras

- Figura 1 - Imagens obtidas por microscopia que mostram elementos característicos do fungo *M. furfur*
- Figura 2 - Alterações da pigmentação normal da pele causadas por *Malassezia furfur*
- Figura 3 - Descamação no couro cabeludo provocada pela caspa
- Figura 4 - Onicomicose subungueal distal e lateral
- Figura 5 - Onicomicose superficial branca
- Figura 6 - Onicomicose subungueal proximal
- Figura 7 - Anatomia da unha
- Figura 8 - Formação da lâmina ungueal a partir da zona proximal com origem na matriz e posterior invaginação
- Figura 9 – Hemorragias nas unhas
- Figura 10 - A pele humana esquematicamente
- Figura 11 - Vias de penetração dérmica
- Figura 12 - Avaliação da adesão e tempo de secagem da preparação obtida
- Figura 13 - Preparações de hipromelose
- Figura 14 - Preparações de hipromelose adicionadas ao BICI9
- Figura 15 - Preparações de hipromelose analisadas em placas de vidro
- Figura 16 - Preparação final acondicionada
- Figura 17 - Creme obtido sem BICI9
- Figura 18 - Creme contendo BICI9
- Figura 19 - Creme obtido sem BICI9
- Figura 20 - Creme contendo BICI9
- Figura 21 - Creme para aplicação cutânea contendo BICI9 acondicionado em frascos de polietileno com tampa de polipropileno.
- Figura 22 - Preparações finais obtidas e BICI9

Índice de Tabelas

Tabela 1 - Géneros de fungos suscetíveis de provocar dermatofitoses e espécies correlacionadas

Tabela 2 – Antifúngicos de ação sistémica

Tabela 3 - Antifúngicos de ação tópica

Tabela 4 – Antifúngicos usados no tratamento de infeções fúngicas cutâneas e onicomicose

Tabela 5 - Células sensoriais que constituem a derme

Tabela 6 - Reagentes usados nos ensaios de solubilidade e estabilidade do Eudragit® E100

Tabela 7 - Formulação final

Resumo

Os fungos apresentam características que os tornam organismos diferentes e, por isso, são classificados num reino à parte das plantas e dos restantes organismos. Podem apresentar dimensões consideráveis, como os cogumelos, ou muitas formas microscópicas, como bolores e leveduras.

Diversas espécies instalam-se no corpo humano e podem causar várias doenças, tornando-se bastante prejudiciais para a saúde humana. Quando os fungos permanecem e se multiplicam no organismo humano, desencadeando uma resposta imunológica e o aparecimento de sintomatologia, significa que o fungo provocou uma infeção que se denomina micose. Dermatofitoses são as infeções provocadas por fungos dermatófitos. Estes fungos são responsáveis por grande parte das infeções que afetam a pele, cabelo e fâneros (unhas). As infeções que afetam as unhas têm o nome de onicomicose e têm relevância clínica pela sua prevalência, não só em indivíduos com o sistema imunitário comprometido, diabetes, entre outras doenças, mas também em indivíduos imunocompetentes e na população em geral, com uma prevalência de 10 a 12%.

Atendendo à elevada incidência das infeções fúngicas e ao desconforto da sua presença, não só patológico, mas também estético, torna-se importante desenvolver formulações de aplicação tópica rápida e simples, que comecem a travar a progressão da doença e que melhorem o aspeto da zona onde se está a desenvolver.

Neste trabalho, atendendo ao potencial antifúngico de extratos derivados de granulado de cortiça, pretende-se desenvolver novas formulações farmacêuticas de aplicação tópica adequadas à administração dos compostos ativos do extrato (API) em estudo. Considerando a ação terapêutica deste (antifúngico), os alvos da formulação são a pele e fâneros (unhas), pelo que se desenvolveram um creme e um verniz. Para além das características tecnológicas das formulações a desenvolver, impõe-se adequar as suas propriedades cosméticas.

Palavras-chave: Fungos; Micose; Dermatófitos; Pele; Fâneros (Unhas); Formulações de aplicação tópica; Extratos derivados de granulado de cortiça; Antifúngico; Creme; Verniz

Abstract

The fungi have characteristics that make them different organisms and, therefore, are classified as a separate kingdom of plants and other organisms. May have considerable dimensions, such as mushrooms, or many microscopic forms such as molds and yeasts.

Several species settle in the human body and may cause several diseases making it quite harmful to human health. When the fungi multiply, and remain in the human body, starting an immune response and the appearance of symptoms means that the infection caused a fungus which is called ringworm. Dermatophytosis infections are caused by dermatophytes. These fungi are responsible for most of the infections affecting the skin, hair and nails. Infections that affect the fingernails are called onychomycosis and have clinical relevance because of its prevalence, not only in individuals with compromised immune systems, diabetes, among other diseases, but also in immunocompetent individuals and in the general population, with a prevalence of 10 to 12 % .

Considering the high incidence of fungal infections and discomfort of its presence not only pathological, but also aesthetic, it is important to develop topical formulations quick and simple, they begin to halt the progression of the disease and to improve the appearance of the area where it is developing.

In this work, given the antifungal activity of extracts derived from granulated cork, it is intended to develop new pharmaceutical formulations suitable for topical administration of the active compounds of the extract (API) under study. Considering the therapeutic action of this (antifungal), the targets of this formulation are skin and nails at which developed a cream and a nail enamel. In addition to the technological characteristics of the formulations to develop, it must suit their cosmetic properties.

Keywords: Fungi; Ringworm; Dermatophytes; Skin; Nails; Formulations for topical application; Extracts derived from granulated cork; Antifungal; Cream; Nail Enamel

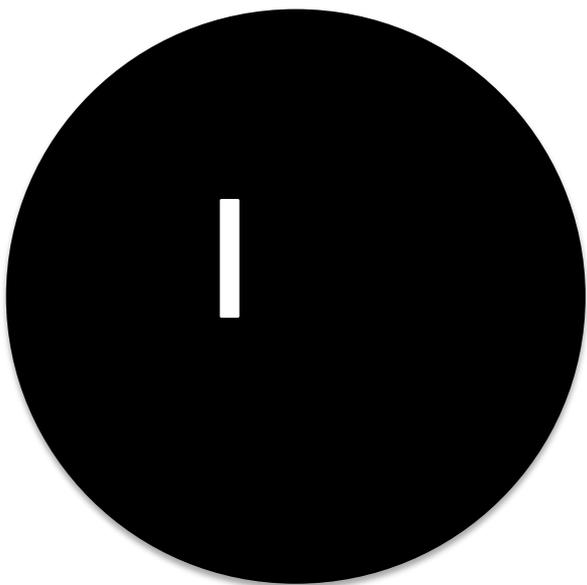
Índice

Capítulo I: Introdução	1
I.1. Fungos	3
I.2. Problemas causados por fungos	4
I.2.1. Infecções fúngicas cutâneas	4
I.2.2. Infecções fúngicas vaginais	16
I.2.3. Infecções fúngicas da mucosa oral e esófago	17
I.2.4. Infecções dos órgãos internos	17
I.3. Diagnóstico das doenças causadas por fungos	19
I.4. Prevenção e Tratamento das infecções fúngicas	20
I.4.1. Medicamentos antifúngicos já comercializados	21
I.4.2. Infecções fúngicas cutâneas	24
I.5. Fâneros (unhas) e Pele	27
I.5.1. Unha	27
I.5.2. Pele	31
Capítulo 2 : Necessidades de formulações de ação tópica antifúngica	37
2.1. Objetivos do trabalho	39

2.1.1. Objetivos específicos	39
Capítulo 3 : Desenvolvimento de formulações farmacêuticas de ação tópica – Requisitos	40
Capítulo 4 : Desenvolvimento de um verniz de aplicação tópica na Unha	42
4.1. Introdução	43
4.2. Materiais	46
4.3. Métodos	47
4.3.1. Ensaio de solubilidade e estabilidade do extrato	47
4.3.2. Ensaio de solubilidade e estabilidade do Eudragit® E100	47
4.3.3. Ensaio de adição do plastificante	48
4.3.4. Ensaio de secagem e fixação da preparação obtida	48
4.3.5. Ensaio de adição do viscosificante	49
4.3.6. Formulação final	50
4.3.7. Acondicionamento	50
4.4. Resultados e discussão	52
4.4.1. Características de solubilidade do extrato que condicionam a estabilidade da formulação final	52
4.4.2. Características organolépticas das formulações desenvolvidas	53

4.4.3. Caraterísticas da textura das formulações desenvolvidas	53
4.5. Conclusões	54
Capítulo 5 : Desenvolvimento de um creme de aplicação na pele	56
5.1. Introdução	57
5.2. Materiais	59
5.3. Métodos	60
5.3.1. Preparação da fase oleosa	60
5.3.2. Preparação da fase aquosa	60
5.3.3. Mistura das duas fases	60
5.3.4. Adição da fragrância	61
5.3.5. Estabilidade do extrato no creme	61
5.3.6. Acondicionamento	61
5.4. Resultados e Discussão	62
5.4.1. Caraterísticas organoléticas das formulações desenvolvidas	62
5.4.2. Caraterísticas da textura das várias formulações	63
5.4.3. Acondicionamento	64

5.5. Conclusões	65
Capitulo 6 : Conclusões Gerais	67
Capitulo 7 : Perspetivas Futuras	73
Capitulo 8 : Anexos	76
Capitulo 9 : Bibliografia	88



Introdução

Muitos fungos apresentam potencial patogênico para os humanos. De acordo com os tecidos e órgãos afetados, as micoses são classificadas em micoses superficiais; micoses da pele, pelos e unhas; micoses subcutâneas e micoses sistêmicas ou profundas.

Nos últimos vinte anos, para além da elevada prevalência de infeções fúngicas cutâneas e das unhas, a frequência das infeções fúngicas sistêmicas, principalmente as oportunistas invasivas, têm crescido drasticamente. Entre estas, a mais comum é a candidíase, seguida da aspergilose, que apresenta maior mortalidade. O aumento no número de infeções fúngicas deve-se a fatores como a imunossupressão causada pela Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (SIDA), por transplantes ou, ainda, resultante da quimioterapia com antitumorais. Outros possíveis fatores incluem o uso indiscriminado de antimicrobianos de largo espectro; o uso crónico de corticóides; a prática de procedimentos médicos invasivos, como cirurgias, e o uso de cateteres, como na nutrição parenteral e hemodiálise. Também deve ser considerado o envelhecimento populacional, que existe principalmente nos países desenvolvidos e é uma tendência mundial.

Atendendo ao exposto anteriormente, torna-se importante desenvolver formulações de aplicação rápida e simples e que sejam eficazes no tratamento de infeções fúngicas, com os menores efeitos indesejáveis possíveis. O presente trabalho compreende, o desenvolvimento de novas formulações farmacêuticas de ação tópica, derivadas de produtos naturais, com potencial ação antifúngica, adequadas à administração dos compostos ativos do extrato (API) em estudo. Em particular, estudou-se um subproduto da indústria corticeira, granulado de cortiça. Considerando a ação terapêutica já comprovada deste (antifúngico), os alvos da formulação são a pele e fâneros (unhas), visto serem das zonas mais afetadas por fungos, pelo que, e atendendo ao local de ação da substância ativa, considerou-se relevante o desenvolvimento de um creme para aplicação tópica e de um verniz.

I.1. Fungos

Durante muitos anos, os fungos foram considerados como vegetais, porém, a partir dos anos sessenta, passaram a ser classificados num reino à parte (Reino *Fungi*). Por apresentarem características próprias, tais como: não sintetizarem clorofila, não possuem celulose nas suas paredes celulares (exceto alguns fungos aquáticos) e não armazenam amido, foram diferenciados das plantas. Os fungos são seres vivos eucarióticos, podendo apresentar um ou mais núcleos (BERGOLD e Georgiadis 2004). Estão incluídos neste grupo organismos de dimensões consideráveis, como os cogumelos, mas também muitas formas microscópicas, como bolores e leveduras.

Os fungos podem ser encontrados em vários suportes tais como: pão e derivados de frutas em deterioração, no solo, na água, em vegetais, em animais, no ar e em detritos em geral (BERGOLD e Georgiadis 2004). Algumas espécies levedam o pão e as massas ou podem ser usadas na produção de cerveja e alimentos; a partir de outras podem ser extraídas substâncias usadas no domínio farmacêutico, como por exemplo, a penicilina, a partir da qual, foram posteriormente obtidos, por processos biotecnológicos, muitos dos antibióticos constantes do atual arsenal terapêutico.

Existem mais de cem mil tipos ou espécies diferentes de fungos e todos eles necessitam de uma matriz para extrair os seus elementos de composição. Alguns necessitam de madeira, folhas secas, cereais, queijo, fruta, frutos secos, pão ou especiarias em pó; podem desenvolver-se mesmo no organismo humano ou nos animais. Os chamados dermatófitos (literalmente significa "crescer na pele") utilizam a queratina como nutriente. Existem outros fungos que necessitam de açúcares ou gorduras como as leveduras, dos quais existem diferentes tipos. Dos mais conhecidos destacam-se o *Candida* e o *Pityrosporum*, que estão na base de várias infeções cutâneas e das mucosas. As infeções por fungos *Aspergillus* ocorrem com bastante frequência nas pessoas com resistência imunitária enfraquecida, podendo ser muito agressivas.

Quando os fungos permanecem e se multiplicam no organismo humano podem desencadear uma resposta imunológica e o aparecimento de sintomatologia associada. Dada a elevada proliferação dos fungos, a exposição involuntária é inevitável. Em condições favoráveis os fungos reproduzem-se, podendo dar origem ao processo infeccioso, sendo as infeções causadas por fungos denominadas por micoses.

1.2. Problemas causados por fungos

Entre as várias espécies de fungos, algumas podem causar doenças ao homem. Os fungos que crescem no corpo humano, têm formas tão pequenas com dimensões microscópicas, sendo aquilo que efetivamente se vê, sente e cheira uma consequência do crescimento fúngico, como por exemplo, uma irritação cutânea, língua saburrosa ou corrimento vaginal branco.

As infecções causadas por fungos em humanos são várias e podem manifestar-se em diferentes locais do corpo. Consoante a área infetada, os sintomas podem variar substancialmente.

De um modo geral, os fungos podem causar dois tipos de infecções: sistêmicas e superficiais. Infecções sistêmicas afetam órgãos internos. São as infecções mais graves, mas menos frequentes. Geralmente começam nos pulmões e, em situações mais graves, podem espalhar-se para o sangue, cérebro, coração, ou outras partes do corpo. Infecções superficiais são as mais comuns e afetam a superfície do corpo, como a pele, as unhas e o couro cabeludo. Ocorrem mais frequentemente em áreas húmidas e de mais fácil transpiração, como por exemplo entre os dedos dos pés e nas virilhas.

Das infecções fúngicas mais comuns destacam-se as infecções das unhas e cutâneas, pela facilidade de contato com ambientes onde possam existir fungos, como piscinas públicas e clubes de saúde. Também de realçar, são as infecções das mucosas oral e vaginal, que afetam com frequência crianças e pessoas com carências vitamínicas ou sistema imunitário deprimido.

1.2.1. Infecções fúngicas cutâneas e superficiais

As infecções fúngicas podem desenvolver-se em qualquer ponto da pele: no tronco, braços e pernas, na face, sob o couro cabeludo, nas virilhas, nas plantas dos pés, nas palmas das mãos, entre os dedos das mãos ou dos pés, entre outros. Estas são as infecções fúngicas mais comuns na população em geral e são provocadas por dermatófitos, fungos que podem encontrar-se não só em locais húmidos da pele, como em superfícies ambientais e em utensílios domésticos, roupas e toalhas.

Dermatófitos é o nome dado ao grupo de três géneros de fungos: *Epidermophyton*,

Microsporium e *Trichophyton* (Tabela I), que causam infecções em animais e humanos, denominadas dermatofitoses.

Tabela I - Gêneros de fungos suscetíveis de provocar dermatofitoses e espécies correlacionadas

<i>Trichophyton</i>	<i>Microsporium</i>	<i>Epidermophyton</i>
<i>T. tonsurans</i>	<i>M. audouinii</i>	<i>E. floccosum</i>
<i>T. Mentagrophytes</i>	<i>M. canis</i>	
<i>T. rubrum</i>	<i>M. gypseum</i>	
<i>T. shoenleinii</i>		

Os dermatófitos são fungos filamentosos que formam hifas organizadas em micélios. São capazes de causar infecções na pele, cabelo e unhas, devido à sua capacidade de obter nutrientes a partir de matéria queratinizada. Alguns, como o *M. gypseum* são geofísicos, ou seja, existem no solo e infetam por contato continuado com o mesmo. Outros estão mais adaptados à infecção de animais, como por exemplo o *M. canis*.

Ao colonizarem os tecidos queratinizados, os fungos provocam inflamação. Geralmente a sua ocorrência restringe-se a camadas superficiais, devido à sua incapacidade de penetrar nos tecidos vivos de hospedeiros imunocompetentes. A maioria das pessoas desenvolve alguma resistência aos fungos depois da infecção, mas outras parecem ter uma suscetibilidade a infecções fúngicas, que em alguns casos e passado algum tempo, poderá tornar-se familiar, se não for convenientemente tratada.

As infecções fúngicas na pele caracterizam-se frequentemente pelo aparecimento de manchas redondas avermelhadas, em que a pele fica irritada e esfolada, e às quais se dá o nome de tinha. Esta afeção corresponde à micose causada por diversos tipos de fungos na pele, que geralmente se classifica de acordo com a sua localização no corpo.

A tinha do corpo corresponde a uma micose superficial da pele (*Tinea corporis*), que se pode desenvolver em qualquer parte da pele de modo localizado, ou generalizado, e é caracterizada pela presença de manchas arredondadas acompanhadas de prurido. Afeta zonas como o tronco e membros e apresenta maior incidência nos obesos. É frequentemente causada pelos fungos *T. mentagrophytes*.

Das infecções que mais afetam a pele destaca-se a tinha do pé, *Tinea pedis*, ou mais vulgarmente, o “pé-de-atleta”. A dermatofitose dos pés, por vezes também conhecida como

frieira, é talvez a micose da pele mais comum no mundo; ataca preferencialmente a palma do pé e os espaços interdigitais e aparece com maior frequência durante os meses mais quentes. É causada habitualmente pelas espécies *T. rubrum*, *T. mentagrophytes* ou *E. floccosum*, fungos que são transmitidos por contato direto, na maioria das vezes através de pés descalços em piscinas, banheiros e clubes de saúde.

O *Trichophyton*, precisa de determinadas condições para crescer, não sendo suficiente o contato com o fungo para se desenvolver. Além das condições ideais para a proliferação do fungo, algumas pessoas parecem ser naturalmente mais susceptíveis à *Tinea pedis* do que outras. O calçado que não permite a respiração dos pés, ajuda a promover o desenvolvimento fúngico. Também o uso frequente de calçado desportivo (tipo “tênis”) promove o desenvolvimento fúngico. O fungo encontra neste tipo de calçado um ambiente excelente para o seu crescimento, uma vez que para além de serem fechados, estão frequentemente húmidos e quentes devido à transpiração frequente. Daí também o nome de “pé-de-atleta”. Apesar de pessoas completamente saudáveis também poderem desenvolver dermatofitose dos pés, indivíduos de elevada sudorese, HIV positivos, diabéticos, imunodeprimidos (SMITH, Welsh e Skelton 2001), portadores de outras infeções, doentes com psoríase ou outras doenças da pele acometendo os pés, possuem maior risco de a desenvolver.

Na maioria dos casos, a pele fica branca, macia entre os dedos, resultando em descamação e prurido. Por vezes também podem formar-se lesões vesiculares nos espaços interdigitais e desenvolver-se infeção na planta dos pés. Apenas um, ou ambos os pés podem ser afetados.

O fungo *Trichophyton rubrum*, que frequentemente provoca a tinha do pé, é o mesmo que causa a micose da virilha. Por isso, em muitos casos, desenvolve-se dermatofitose nos pés e na virilha ao mesmo tempo.

A micose que se desenvolve na zona das virilhas, chamada *Tinea cruris*, é caracterizada por lesões escamosas avermelhadas nas regiões inguinais, coxas e nádegas (zonas genitais), acompanhadas de intenso prurido. A pele apresenta áreas vermelhas e anelares, por vezes com formação de pequenas bolhas na zona das virilhas e na parte superior interna das coxas.

A tinha inguinal é muito mais frequente em homens do que em mulheres e a maioria dos casos são causados pelo fungo *Trichophyton rubrum*.

Este fungo pode ser um habitante normal da pele, não provocando, por isso, doenças, uma vez que o sistema imunitário consegue mantê-lo sob controlo, desde que a

pele se mantenha limpa e seca. No entanto, em épocas de maior calor, algumas áreas do corpo ficam constantemente transpiradas e quentes, tal como a virilha e a região genital, favorecendo a proliferação de fungos e o aparecimento de micoses. Neste tipo de infecção é frequente a recidiva, já que os fungos podem persistir sobre a pele, e mesmo com um tratamento apropriado, alguns doentes, podem apresentar infecções repetidas.

Um outro tipo de infecção fúngica que pode provocar lesões cutâneas e que existe em todo o mundo, principalmente em zonas de climas temperados, como nos países tropicais, é a *Pitiríase versicolor*. É causada pela *Malassezia furfur*, uma levedura lipofílica que faz parte da composição microbiana normal da pele humana. A fase de levedura desse organismo apresenta duas formas morfológicamente distintas, uma ovóide, outra esférica, nas quais o fungo é denominado *Pityrosporum ovale* e *Pityrosporum orbiculare*, respectivamente (Figura 1).

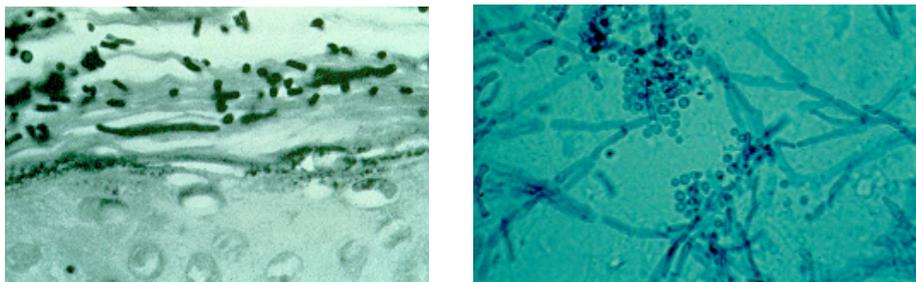


Figura 1 - Imagens obtidas por microscopia que mostram elementos característicos do fungo *M. furfur* (ELLIS s.d.)

A *Pitiríase versicolor* é uma infecção geralmente crónica e superficial da pele, podendo, por vezes, provocar algum prurido. Caracteriza-se pelo aparecimento de manchas brancas, rosadas, castanhas bem marcadas, ou lesões acastanhadas, cobertas com finas escamas furfuráceas, que provocam a descamação da pele. Normalmente são pequenas e estão isoladas, mas podem confluir numa área maior despigmentada. A cor, relacionada com a hipo ou hiperpigmentação, varia de acordo com a pigmentação normal do doente e com a gravidade da doença. Essa alteração pode ser potenciada pela exposição à luz solar, ficando as manchas mais evidentes, uma vez que se destacam na pele bronzeada não comprometida pela infecção (Figura 2).



Figura 2 - Alterações da pigmentação normal da pele causadas por *Malassezia furfur* (ELLIS s.d.)

As lesões ocorrem no tronco, ombros e braços e com menos frequência no pescoço e no rosto (ELLIS s.d.). Manifestam-se principalmente no Verão e na Primavera, atingindo maioritariamente os jovens adultos de pele oleosa, apesar de também se poder desenvolver em crianças e idosos. Afeta ambos os sexos, de todas as raças, e não é contagiosa.

A foliculite, dermatite seborreica e fungemia são outros processos associados a *Malassezia furfur*, decorrente de nutrição parenteral lipídica. Também podem ocorrer pequenas lesões embólicas pulmonares e em outros órgãos internos como uma complicação de fungemias (ELLIS s.d.).

Esta micose responde bem ao tratamento, que pode ser feito com medicamentos de ação local ou por via oral. No entanto, por ser causada por um fungo que habita normalmente a pele, a micose pode apresentar recidivas, voltando a reaparecer logo após um tratamento bem sucedido. Estes casos exigem cuidados especiais para a prevenção do retorno da doença, cuja orientação deve ser dada pelo médico dermatologista.

Estes tipos de infeções fúngicas são alguns dos exemplos que afetam a pele, mas os fungos também afetam outras zonas do corpo, como a face, particularmente masculina, e o couro cabeludo.

A *Tinea barbae* (tinha da barba) é uma infeção por dermatófitos superficial (género *Trichophyton*) que habitualmente se limita às áreas de barba, do rosto e pescoço, e ocorre em homens mais velhos, adolescentes e adultos. A apresentação clínica desta tinha pode ser do tipo inflamatório e supurativo (com pus), tipo “herpes” com lesões eritematosas

(vermelhas) papulosas (elevadas na pele) em forma de vesículas e descamativa nas bordas da lesão, ou do tipo sicosiforme que se assemelha à foliculite bacteriana (inflamação dos folículos pilosos por agentes bacterianos).

A tinha da barba é normalmente rara e o diagnóstico diferencial deve ser feito principalmente com a alopecia areata da barba, vulgarmente “pelada”, onde ocorre a perda de pelos em áreas arredondadas ou ovais, bem delimitadas e circunscritas, e a sicose, onde os exames bacteriológicos e micológicos mostram a presença de bactérias e fungos característicos da doença .

Ao nível do couro cabeludo, a caspa é provavelmente um dos problemas dermatológicos mais antigos que afeta as pessoas. A sua etiologia ainda não totalmente esclarecida, parece ser multifatorial e acredita-se que a oleosidade excessiva e a presença do fungo *Malassezia furfur* estão relacionados com o seu aparecimento. Quando o estrato córneo mantém a sua função de barreira, evitando a perda de água e mantendo a hidratação do couro cabeludo, protege-o contra fatores possíveis de desencadear a caspa e até pode evitar a invasão por *Malassezia furfur*. As alterações na função normal do estrato córneo podem prejudicar a hidratação adequada, levando à proliferação atípica epidérmica, diferenciação e maturação dos queratinócitos, que podem causar alguns sintomas da caspa (TURNER, Hoptroff e Harding 2012). Pode também ser agravada com o frio, baixa frequência de lavagens dos cabelos e estado de tensão nervosa, fatores que propiciam a proliferação de microrganismos, como bactérias e fungos no couro cabeludo.

A caspa, também conhecida como seborreia, é mais comum em indivíduos do sexo masculino e pode ser mais intensa em recém-nascidos e a partir da adolescência.

A dermatite seborreica é uma doença da pele que ataca o couro cabeludo, face e algumas outras regiões de corpo, principalmente onde a presença de glândulas sebáceas é maior. As manifestações clínicas são: intensa produção de oleosidade (seborreia), descamação (caspa) e aparecimento de lesões avermelhadas e eritema, acompanhados de prurido.

A caspa pode variar desde fina descamação, até à formação de grandes crostas aderentes ao couro cabeludo, e o prurido pode tornar-se intenso (Figura 3).

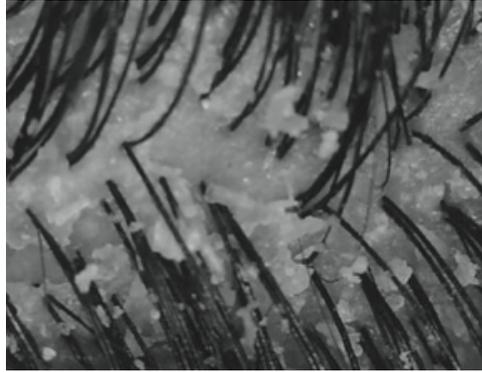


Figura 3 - Descamação no couro cabeludo provocada pela caspa (TURNER, Hoptroff e Harding 2012)

Normalmente o diagnóstico é clínico, feito por meio da localização e do tipo das lesões, associados com fatores desencadeadores. Raramente é necessária a realização de exames de pele, como biópsia, para o diagnóstico diferencial com outra doença de pele.

A tinha da cabeça ou do couro cabeludo, *Tinea capitis*, é a dermatofitose do couro cabeludo causada principalmente por dermatófitos dos gêneros *Trichophyton* e *Microsporum*, que invadem a haste do cabelo.

A apresentação clínica consiste na presença de manchas únicas ou múltiplas de perda de cabelo, por vezes com um padrão de “pontos pretos”, devido a cabelos quebrados. Estas manchas são muitas vezes acompanhadas de inflamação, descamação, pústulas e comichão, onde o fungo se encontra enraizado na pele. O couro cabeludo pode apresentar aspecto idêntico a caspa ou dermatite seborreica, podendo ser difícil de distinguir de outras doenças da pele, tais como psoríase e dermatite seborreica.

Existem três tipos de *Tinea capitis* dependendo do microrganismo causador e da natureza dos sintomas: *microsporiasis*, *trichophytosis* e *favus*. Uma tinha do tipo *microsporiasis* consiste numa lesão sob a forma de uma pequena pápula vermelha em torno de um fio de cabelo, que mais tarde se torna escamosa. Esta doença é causada por fungos do género *Microsporum*. A fonte deste fungo são tipicamente gatos doentes, podendo ser transmitido por contato pessoa a pessoa, ou por partilha de escovas e pentes contaminados. Nos Estados Unidos, *trichophytosis* é geralmente causada por *Trichophyton tonsurans*, enquanto *Trichophyton violaceum* é mais comum na Europa Oriental, África e Índia. *Trichophytosis* é uma tinha que se caracteriza pelo aparecimento de manchas secas, não-inflamatórias, habitualmente em forma angular. Quando os pelos quebram durante a abertura do folículo, pontos pretos permanecem. Por sua vez, *favus* é causada por *Trichophyton schoenleinii* e é endêmica na África do Sul e Médio Oriente. Caracteriza-se por uma série de manchas

amareladas e circulares, com crostas agrupados como um pedaço de favo de mel, cada uma do tamanho de uma ervilha, por vezes com um cabelo no centro. Estes aumentam de tamanho e vão formando mais crostas, de modo que a lesão característica só pode ser vista em torno da borda da crosta.

Outras espécies de fungos responsáveis por causar *Tinea capitis* podem variar de acordo com a região geográfica, e ao longo do tempo.

As micoses causadas pelas espécies *Microsporum* e *Trichophyton* são doenças contagiosas e endémicas em muitos países, afetando principalmente crianças pré-púberes entre 6 e 10 anos. São mais comuns no sexo masculino do que no feminino e podem ser transmitidas por seres humanos, animais, ou objetos que abrigam o fungo. O fungo pode também existir num estado de portador sobre o couro cabeludo, sem sintomatologia clínica.

O tratamento desta infeção fúngica implica a utilização de antifúngicos de administração oral, de modo a que se façam chegar os compostos antifúngicos à haste do cabelo onde o fungo vive, não sendo habitualmente tratável com compostos de ação tópica.

Os fungos também afetam as unhas (fâneros), causando uma infeção fúngica na unha, a onicomicose (GELOTAR, et al. 2013), *Tinea unguium* ou tinha das unhas dos pés ou das mãos.

A micose das unhas pode ser causada por várias espécies de dermatófitos, que existem com elevada frequência em unhas distróficas (WALLING 2009) e estes são os fungos responsáveis pela maioria das infeções nas unhas. Outro grupo de fungos que também pode causar micose de unha são as leveduras e/ou bolores. Por vezes, pode desencadear-se uma infeção mista (GELOTAR, et al. 2013). Em geral, as leveduras causam OM nas mãos e os dermatófitos provocam onicomicose nas unhas dos pés. Os dermatófitos que mais provocam OM são *Trychophyton rubrum*, *Trychophyton mentagrophytes* e *Epidermophyton floccosum* e as leveduras incluem *Cândida albicans*, *Cândida parapsilosis*, *Cândida tropicalis*, entre outras. Por sua vez os bolores incluem uma ampla variedade de fungos, como *Scytalidium spp.*, *Aspergillus spp.*, *Geotrichum candidum* e *Fusarium spp.* (GELOTAR, et al. 2013) (ARAÚJO, et al. 2003).

Os fungos que provocam a micose de unha são habitualmente adquiridos no ambiente, principalmente em locais quentes e húmidos, propícios para o seu crescimento, tais como banheiros, chuveiros, vestiários e piscinas públicas. Assim, frequentar estes espaços sem calçado, é um importante fator de risco para adquirir micose nas unhas. No entanto, o contato com o fungo por si só habitualmente não é suficiente para se adquirir a

OM, sendo para isso necessária a existência de pequenas lesões entre a unha e a pele, ou outros fatores, para que o fungo consiga penetrar por baixo da unha e aí se alojar. Também é necessário que a unha seja exposta frequentemente a ambientes húmidos para que o fungo se consiga multiplicar com mais facilidade. De modo a não permitir o desenvolvimento fúngico, deve-se evitar que os pés passem muito tempo dentro de meias e calçado fechado, ficando quentes e húmidos pelo suor.

A OM é das doenças mais frequentes das unhas, representando cerca de 50% das infeções das unhas (GELOTAR, et al. 2013) (ELEZOVIC, et al. 2010), com uma estimativa de prevalência de 10% na população em geral e de aproximadamente 60% em idosos (WALLING 2009). Em alguns países a OM pode chegar a afetar 18% da população em geral (ELEZOVIC, et al. 2010). Estudos mostram que a OM é muito comum na meia-idade, entre os 31 e 40 anos, devido a lesões traumáticas repetidas no trabalho, práticas desportivas, entre outros fatores. Em pessoas mais velhas o aparecimento das infeções fúngicas é devido a fatores como: imunidade baixa, fraca circulação periférica, cuidados pessoais deficientes e presença de algumas doenças, frequentemente diabetes. Parece ser mais frequente em mulheres do que em homens e em crianças é menos comum (GELOTAR, et al. 2013).

A micose da unha desenvolve-se muitas das vezes associada com a *Tinea pedis*, sendo, por vezes, isolados dermatófitos em unhas clinicamente normais na presença da tinea do pé (WALLING 2009); pode ser transmitida de uma pessoa para outra, apesar de ser pouco comum, exceto quando se compartilha material íntimo e de uso pessoal, como lixas ou cortadores de unhas. Para além disso, alguns fatores favorecem a infeção provocada por fungos nas unhas, tal como: idade mais avançada, história familiar, doentes com frieiras, com psoríase, com problemas de circulação sanguínea dos membros inferiores e periférica, *Diabetes mellitus*, HIV, cancro, problemas imunológicos e uso de drogas imunossupressoras, entre outros fatores (WALLING 2009) (GELOTAR, et al. 2013). Em pacientes diabéticos ou imunodeprimidos, a OM pode servir como porta de entrada para bactérias, favorecendo o surgimento de infeções secundárias, como erisipela ou celulite. Os atletas também são um grupo de risco para OM; estes indivíduos costumam estar com os pés frequentemente quentes e húmidos pela transpiração, além de terem uma maior incidência de traumas nas unhas devido ao impacto nas suas atividades físicas. Acrescenta-se ainda que o fato dos dedos dos pés estarem no ponto do corpo mais distante do coração, não sendo tão bem vascularizados como os dedos das mãos, faz com que os anticorpos e as células de defesa do organismo não chegam às unhas dos pés com tanta facilidade como a outros pontos do

organismo, potenciando o aumento da incidência nas unhas dos pés comparativamente com as das mãos.

As alterações nas unhas provocadas pela onicomicose são uma questão estética, em vez de um problema médico (GELOTAR, et al. 2013). Mas, muitas vezes, a OM é sintomática, causando dor e desconforto ao andar e destruição da unha. Estas situações podem causar incapacidade funcional, levando a efeitos emocionais importantes, que podem ter um impacto significativo na qualidade de vida (WALLING 2009). As lesões da unha provocadas pela OM apresentam algumas variações na sua apresentação; dependendo do tipo de fungo e da gravidade da infeção, podem apresentar desde simples manchas esbranquiçadas a espessamentos com destruição da lâmina externa da unha e hiperqueratose subungueal, com descoloração da unha (unha amarela grossa) (WALLING 2009). O fungo penetra na parte recém-formada da unha, provocando espessamento e distorções na sua forma normal. Também é frequente a perda de brilho e alteração de cor, com escurecimento, deixando-a opaca, o que permite que o diagnóstico por análise clínica seja suficiente (WALLING 2009). No entanto, e em algumas situações, as lesões nas unhas causadas pela OM podem causar confusão com as lesões provocadas por outras doenças, como psoríase, eczemas, traumas, ou outras, pelo que se torna necessária a realização de avaliação laboratorial. Assim é possível comprovar a presença do fungo antes de se iniciar o tratamento com antifúngicos. Este é o procedimento ideal.

Atendendo à zona da unha afetada, a OM pode ser classificada de diferentes formas, variando também a sua incidência na população.

Quando a OM afeta a ponta da unha, esta denomina-se por onicomicose subungueal distal e é o tipo de micose da unha mais comum (Figura 4).

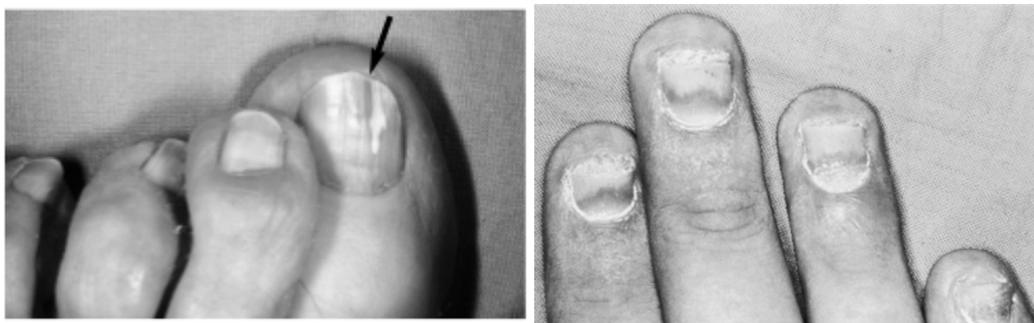


Figura 4 - Onicomicose subungueal distal e lateral (RODGERS e Bassler 2001)

A infeção começa com uma descoloração esbranquiçada, amarelada ou acastanhada numa das pontas laterais da unha, estendendo-se lentamente por toda unha. A unha pode

mesmo levantar e até descolar e a ponta costuma partir-se e cair, expondo a pele.

A OM superficial branca caracteriza-se pelo aparecimento de manchas brancas sobre a superfície da unha, geralmente mais próxima da cutícula do que da ponta que, quando não convenientemente tratadas, tendem a espalhar-se por toda a unha, deixando-a quase toda branca, além de áspera e quebradiça (Figura 5).



Figura 5 - Onicomicose superficial branca (RODGERS e Bassler 2001)

É comum em crianças, mas nos adultos corresponde apenas a 10% da totalidade dos casos de micose na unha.

Por sua vez, a onicomicose proximal corresponde clinicamente a uma infecção do tipo da onicomicose distal, mas em que a sua progressão ocorre de forma oposta, iniciando-se próxima à cutícula e depois estendendo-se em direção à ponta da unha (Figura 6).



Figura 6 - Onicomicose subungueal proximal (RODGERS e Bassler 2001)

É a forma menos comum de onicomicose, ocorrendo geralmente em pacientes imunodeprimidos e, por isso, comum nos indivíduos com HIV.

Por vezes e quando a infecção fúngica se desenvolve por toda a unha de forma mais ou menos uniforme a OM adquire a designação de onicomicose distrófica total (GELOTAR, et al. 2013).

Relativamente à sua eliminação, a OM é uma infecção que requer tempo para o tratamento, uma vez que as unhas crescem lentamente e recebem pouca irrigação sanguínea. Até há algum tempo, os medicamentos utilizados para o tratamento da OM não eram muito eficazes e os resultados eram pouco significativos. A partir da introdução de medicamentos antifúngicos orais mais eficazes e do desenvolvimento de formulações farmacêuticas inovadoras (BERGOLD e Georgiadis 2004), os tratamentos para pessoas com OM melhoraram substancialmente. Uma vez tratada a infecção, a taxa de reinfeção pode chegar a 50%, principalmente quando os doentes descuidam a situação. Portanto, é necessário ter alguns cuidados para que as unhas não voltem a ser afetadas por fungos. Assim, a importância da onicomicose reside no aumento da sua prevalência. O tratamento representa uma das principais dificuldades terapêuticas; não é sempre efetivo, pois a maioria dos fármacos antifúngicos disponíveis produzem recorrência ou causam resistência (OLIVEIRA, et al. 2011), pelo que pode ser necessário tratamento por um longo período de tempo (GELOTAR, et al. 2013).

É uma infecção que deve ser considerada importante pelo dano que acarreta. A qualidade de vida dos doentes é prejudicada, a autoestima pode ser reduzida e a capacidade funcional por vezes é afetada de maneira a interferir em atividades de rotina quotidiana (GELOTAR, et al. 2013). A OM pode agravar outras afeções clínicas, especialmente no indivíduo idoso e a incidência de infecções secundárias por outros microrganismos é mais alta nos pacientes diabéticos com OM do que em diabéticos que não apresentam tal afeção. O aumento da OM está seguramente relacionado com o aumento da frequência de academias e ginásios de preparação física, e a maior participação em atividades desportivas comunitárias, tal como com o incremento do uso de corticosteróides, de antibióticos, de fármacos imunossupressores e também em doentes transplantados (SMITH, Welsh e Skelton 2001). Também o aumento de casos de HIV contribui para o aumento do número de pessoas infetadas por dermatófitos (GELOTAR, et al. 2013).

Para evitar a progressão da OM o diagnóstico deve ser feito o mais cedo possível, recorrendo não só à observação clínica, mas também a técnicas laboratoriais (GELOTAR, et al. 2013) que permitam detetar o agente etiológico.

As tinas normalmente não são perigosas, uma vez que as mais frequentes são aquelas em que o fungo apenas se alimenta das células queratinizadas, não invadindo o organismo. Contudo, a sua eliminação é de difícil resolução, porque o sistema imunitário não tem acesso a esses tecidos externos mortos. As tinas podem manter-se para sempre,

especialmente nas zonas húmidas e interdigitais, mas o tratamento pode resolver as infeções ou diminuir a sua intensidade.

1.2.2. Infeções fúngicas vaginais

Um pequeno corrimento vaginal é normal, e ao longo do ciclo menstrual as características deste corrimento podem variar. No entanto, algumas alterações como corrimento excessivo, aliado a uma sensação de prurido, podem ter várias causas. Normalmente é causado por um desequilíbrio da flora vaginal, no que se refere à presença de bactérias, parasitas, fungos ou vírus, mas também devido a uma eventual irritação provocada pelo uso de roupas demasiado apertadas ou sintéticas, ou material de higiene íntima de origem sintética, afetando mais umas mulheres do que outras.

Os fungos *Candida* podem ser encontrados na vagina por motivos variados. A espécie mais comum do fungo *Candida* é a *Candida albicans*, considerada um membro normal da flora gastrointestinal e geniturinária dos seres humanos. A maioria das pessoas é colonizada por *Candida* sem apresentarem nenhum sintoma. Porém, qualquer desequilíbrio na flora local ou no estado imunológico pode levar o fungo a proliferar e invadir tecidos, causando, assim, a candidíase. Outros fatores podem levar ao aparecimento da mesma. Um exemplo clássico é o uso de antibióticos por tempo prolongado. Os antibióticos destroem as bactérias, mas não os fungos, reduzindo a competição por alimentos e assim facilitando o desenvolvimento dos fungos que colonizam o organismo.

A proliferação de *Candida* na vagina é uma consequência da diminuição da flora normal de bactérias na vagina e uma das causas mais comuns da vulvovaginite em mulheres de todas as idades. Normalmente, aos 25 anos de idade metade das mulheres já apresentaram pelo menos um episódio de vaginite por *Candida*. A infeção é comum em mulheres em idade fértil, tornando-se menos frequente após a menopausa. O corrimento vaginal numa mulher com candidíase vaginal fica alterado e torna-se espesso, granuloso e branco. Esta alteração é frequentemente acompanhada de irritação, dor e prurido.

A *Candida albicans* é responsável pela maioria dos casos de candidíase vaginal. Alguns fatores favorecem o seu aparecimento; para além do uso de antibióticos já referido, diabetes, níveis elevados de estrogénio, comportamento sexual, predisposição genética e terapêutica imunossupressora, entre outros, potenciam o desenvolvimento deste fungo.

1.2.3. Infecções fúngicas da mucosa oral e esófago

É muito comum encontrar pessoas com “aftas”. As “aftas” são a manifestação da infecção fúngica na mucosa oral, causada pelo fungo *Candida*. Esta infecção caracteriza-se pela presença de pequenas úlceras arredondadas ou ovais que formam uma cobertura branca na boca, com uma membrana mucosa avermelhada. Aparecem frequentemente na língua, parede interna das bochechas e no palato (céu da boca), causando ardor e, por vezes, dor e diminuição do paladar. Quando o esófago também é afetado os doentes têm dor ao engolir.

A candidíase oral costuma indicar um grau de imunidade baixo ou distúrbio na flora normal da boca, principalmente se a candidíase oral estiver associada à candidíase do esófago. Nesta situação, a candidíase deve ser investigada, principalmente se a causa ainda não for conhecida. Também pode ser uma indicação de alterações ou doenças do sistema imunológico em crianças de tenra idade, sendo também conhecida como “sapinhos”. Neste caso, a candidíase é restrita e provoca poucos sintomas.

Até 50% das pessoas saudáveis têm o fungo *Candida* na cavidade oral sem que isso represente qualquer problema. A *Candida albicans* é um fungo oportunista, podendo viver silenciosamente no organismo durante anos. Fatores de risco para o desenvolvimento de candidíase são, por exemplo, o uso de dentadura ou aparelhos dentários que podem fragilizar a mucosa oral, diabetes, doenças que causam diminuição na salivagem (xerostomia) e situações de imunossupressão, seja por doenças, ou pela utilização de determinado tipo de fármacos.

1.2.4. Infecções dos órgãos internos

A maioria das infecções internas são causadas por invasão de fungos do tipo *Aspergillus*. Os esporos destes fungos “invasivos” encontram-se por todo o meio ambiente, podendo ser inspirados durante a respiração e entrar no organismo através dos brônquios. Uma infecção sistêmica provocada por *Aspergillus* pode ser muito perigosa. De fato, é possível encontrar *Aspergillus* em todos os locais e, por isso, além de constituírem um perigo para os indivíduos com sistema imunitário saudável, podem ser muito prejudiciais para os indivíduos cujo sistema imunitário se encontre mais debilitado.

As pessoas mais atingidas são as que sofrem de problemas brônquicos ou as que têm menos resistências, podendo verificar-se o crescimento fúngico no pulmão. Assim, nas

peessoas com as resistências do sistema imunitário gravemente diminuídas, os fungos podem desenvolver-se nos pulmões, acabando por penetrar nos vasos sanguíneos e ter consequências extremamente graves. Com ajuda de medicação, o crescimento destes fungos poderá ser travado, embora o tratamento nem sempre seja eficaz. Em pessoas que sofreram uma doença pulmonar, provocando no tecido pulmonar um espaço não preenchido, por exemplo uma tuberculose, os esporos podem desenvolver-se nesta área pulmonar e formar uma “aspergiloma” ou “bola fúngica”. Em muitos casos, o doente não apresenta quaisquer sintomas, mas, por vezes, o “aspergiloma” ou “bola fúngica” provoca outras doenças.

Os indivíduos com infeção provocada por *Aspergillus* apresentam como sintomas alergia ao fungo ou asma, do qual fazem parte as doenças profissionais que afetam os agricultores, os columbófilos, os cervejeiros, entre outros.

O *Aspergillus* é responsável por infeções brônquicas, embora possa, com menos frequência, afetar também o Sistema Nervoso Central e o trato Gastrointestinal.

As infeções fúngicas são inúmeras e podem afetar uma ou várias partes do organismo humano, de forma localizada ou generalizada. Os tipos de infeções fúngicas tratados anteriormente, são algumas das afeções que os fungos podem causar no ser humano. Desta forma, deve-se estar mais atento a pequenas alterações visíveis, indiciadoras do desenvolvimento fúngico mais profundo.

Ao longo dos últimos anos, a ocorrência de infeções fúngicas em humanos tem apresentado um aumento expressivo. Este aumento deve-se a vários fatores como esquemas e terapêuticas imunossupressores novos e mais agressivos, aumento da vida média dos doentes em cuidados intensivos, cateterização mais frequente e aumento do uso de antibióticos, entre outros. De um modo geral, a população de doentes imunodeprimidos, particularmente suscetível às infeções fúngicas, corresponde a doentes transplantados, neutropénicos, submetidos a tratamentos oncológicos e infetados com HIV.

Assim, tornam-se imperativos a investigação e o desenvolvimento de novos medicamentos que impeçam a proliferação e que tratem as alterações e processos patogénicos causadas por estes organismos, melhorando também o aspeto das zonas afetadas.

I.3. Diagnóstico das doenças causadas por fungos

As infecções fúngicas são muito típicas no seu aspeto e provocam sintomas específicos pelo que, na maior parte das vezes, e com base na sua experiência clínica, o médico consegue diagnosticar a infeção. Habitualmente apenas é efetuado um estudo aprofundado da doença, quando outras infeções, mais perigosas, tiverem de ser excluídas, ou quando a infeção, sob o ponto de vista clínico, seja considerada atípica.

No entanto, para o diagnóstico e tratamento adequados, é necessária a identificação rápida e precisa dos agentes etiológicos em amostras clínicas, utilizando métodos moleculares de confiança. Trabalhos sobre o desenvolvimento de técnicas precisas e rápidas têm sido desenvolvidos.

Recentemente para a identificação dos organismos causadores da *tinea unguium*, foi desenvolvida uma nova PCR em tempo real. Este sistema de PCR é um método biotecnológico dos mais rápidos e sensíveis para diagnosticar agentes etiológicos em doentes com *tinea unguium* e *tinea pedis*, nomeadamente *T. rubrum* e *T. Mentagrophytes* (MIYAJIMA, et al. 2013).

1.4. Prevenção e Tratamento das infecções fúngicas

Por forma a impedir que os fungos invadam o corpo humano para se alimentarem e desenvolverem, devem ser tomadas medidas aquando da frequência de ambientes públicos húmidos e quentes onde eles possam coabitar. Desta forma, deve usar-se calçado e material que impeça o contato direto com os utensílios e zonas onde eles existem. No entanto, e pelo fato de os fungos existirem muito perto dos humanos, é muito difícil prevenir as infecções fúngicas.

Os fungos apresentam uma elevada resistência a fatores externos e, por isso, conseguem sobreviver quase invisíveis, para além de que podem também ser transmitidos de uma pessoa para outra, provocando uma infecção fúngica nesta última. Assim, o tratamento deve ter como objetivos, não só tratar a infecção causada pelo fungo, como também a eliminação total do mesmo. Por outro lado, a doença pode voltar a manifestar-se ao fim de algum tempo. Em geral, as leveduras e os fungos filamentosos não são perigosos, podendo apenas surgirem complicações quando as resistências do indivíduo estão diminuídas; tanto no homem como nos animais, os fungos aproveitam uma lesão na pele ou uma resistência diminuída do sistema imunitário, devido à presença de qualquer doença ou uso de uma determinada medicação. Por isso, quando os fungos invadem o organismo humano, o tratamento pode tornar-se complicado, pois trata-se de uma forma de vida oportunista.

A incidência e a gravidade das infecções fúngicas tem vindo a aumentar de forma alarmante; o tratamento para erradicar estes organismos não satisfaz as necessidades médicas por completo (BERGOLD e Georgiadis 2004). A procura de novos e mais eficazes medicamentos torna-se assim um verdadeiro desafio para os profissionais de saúde. Há pesquisas avançadas e trabalhos importantes a respeito deste assunto e novos medicamentos vão sendo desenvolvidos com o objetivo de proteger o ser humano desta companhia desagradável e prejudicial; novos modelos têm sido desenvolvidos, para aumentar o sucesso do tratamento da OM (LUSIANA, Reichl e Muller-Goymann 2013) (VEJNOVIC, Simmler e Betz 2010), entre outros.

A terapêutica das doenças fúngicas teve dois avanços importantes: o aparecimento de derivados triazólicos para administração oral relativamente bem tolerados e mais recentemente, a descoberta de um novo grupo de antifúngicos, as equinocandinas. Também

importante, tem sido a recriação de novas formulações de fármacos antigos, com o objetivo de diminuir a toxicidade renal (MAGINA 2006).

I.4.1. Medicamentos antifúngicos já comercializados

Encontram-se vários compostos disponíveis para o tratamento das infecções fúngicas, bem como várias formas farmacêuticas, consoante o tipo e a localização da infecção que se pretende tratar. Assim, temos os compostos formulados desde formas farmacêuticas mais comuns, como comprimidos, até produtos que reúnem vários tipos de tecnologias, por forma a aumentar a adesão à terapêutica, como fazer uma simples aplicação na zona afetada, tal como acontece com alguns produtos de ação tópica existentes no mercado.

Os fármacos antifúngicos atualmente disponíveis podem ser divididos em dois grupos: antifúngicos de ação sistémica e antifúngicos tópicos (MAGINA 2006).

O tratamento de infecções fúngicas por ação sistémica pode ser feito com diferentes classes de compostos: polietilenos (anfotericina B), derivados azólicos (cetoconazol, fluconazol, itraconazol e voriconazol), flucitosina, equinocandinas (caspofungina e micafungina), terbinafina e griseofulvina. A terbinafina e a griseofulvina, são antifúngicos usados por via sistémica, mas apenas para tratamento de infecções fúngicas cutâneas. Estes compostos encontram-se comercializados sob diversas formas farmacêuticas, adequadas à via de administração a que se destinam (Tabela 2).

Tabela 2 – Antifúngicos de ação sistêmica

Composto antifúngico	Nome comercial
Anfotericina B	ABELCEPT® AMBISSOME®
Cetoconazol	RAPAMIC®
Flucitosina	ANCOTIL®
Fluconazol	DIFLUCAN® FLUDOCEL® SUPREMASE®
Griseofulvina	FULCIN® GRISOVIN®
Itraconazol	SPORANOX®
Terbinafina	LAMISIL® DASKYL®
Voriconazol	VFOND®

Relativamente aos antifúngicos de ação tópica, os compostos que se encontram comercializados são formulações de derivados imidazólicos, nistatina, ciclopiroxolamina, amorolfina e terbinafina (Tabela 3).

Tabela 3 - Antifúngicos de ação tópica

Composto antifúngico	Nome Comercial
Amorolfina	LOCETAR [®]
Bifonazol	MYCOSPOR [®]
Cetoconazol	TEDOL [®] NIZORAL [®]
Ciclopiroxolamina	MYCOSTER [®]
Clotrimazol	CENESTEN [®]
Econazol	PEVARYL [®]
Miconazol	DAKTARIN [®]
Nistatina	MYCOSTATIN [®]
Omoconazol	FONGAMIL [®]
Sertoconazol	DERMOFIX [®] SERTOPIC [®]
Terbinafina	LAMISIL [®] DASKYL [®]
Tioconazol	TROSYD [®]

Dos antifúngicos atualmente existentes, a anfotericina B é o de mais largo espectro de atividade, desempenhando um papel relevante no tratamento das infecções fúngicas sistêmicas em meio hospitalar.

Relativamente aos derivados azólicos, o cetoconazol foi o primeiro a surgir, permitindo, após administração por via oral, tratar com sucesso infecções fúngicas sistêmicas. Os triazóis (fluconazol e itraconazol) apresentam um espectro de atividade mais amplo e um perfil de reações adversas mais favorável, sendo o cetoconazol considerado, atualmente, como antifúngico de segunda linha. Por sua vez, o itraconazol apresenta maior atividade contra alguns fungos, como o *Aspergillus*, quando comparado com o fluconazol. Eles podem ser administrados por via oral ou parentérica. Em contrapartida, o itraconazol apresenta um perfil de reações adversas e potencial de interações medicamentosas mais desfavoráveis.

Outros derivados do imidazol como o clotrimazol são demasiado tóxicos para uso sistêmico, estando reservados para utilização tópica.

O voriconazol e a caspofungina são dois novos antifúngicos recentemente aprovados para o tratamento de infecções sistêmicas graves, provocadas pelos fungos *Aspergillus* ou *Candida*, em meio hospitalar (INFARMED, Autoridade Nacional do Medicamento e Produtos de Saúde I.P. 2013).

1.4.2. Infecções fúngicas cutâneas

As infecções fúngicas cutâneas têm enorme relevância clínica pela sua prevalência. As mais frequentes são as infecções por dermatófitos, a candidíase e a *pitiríase versicolor*. Em indivíduos imunodeprimidos são importantes as infecções cutâneas por fungos oportunistas (MAGINA 2006).

O tratamento destas infecções pode ser feito por via tópica, ou oral, e com diferentes compostos ativos (Tabela 4).

Tabela 4 – Antifúngicos usados no tratamento de infecções fúngicas cutâneas e onicomicose

Indicação	Antifúngico	Administração
Onicomicose	Amorolfina Ciclopiroxolamina Terbinafina Triazóis Griseofulvina	Tópica Tópica Oral Oral Oral
<i>Tinea corporis</i> localizada	Imidazois Terbinafina Ciclopiroxolamina Amorolfina	Tópica Tópica Tópica Tópica
<i>Tinea corporis</i> generalizada	Triazóis Terbinafina Griseofulvina	Oral Oral Oral
<i>Tinea pedis</i>	Imidazois Ciclopiroxolamina Amorolfina Triazóis Terbinafina Griseofulvina	Tópica Tópica Tópica Oral Tópica e Oral Oral
Candidíase localizada	Imidazois Nistatina Amorolfina Ciclopiroxolamina	Tópica Tópica Tópica Tópica
Candidíase generalizada e mucocutânea	Triazóis	Oral
<i>Pitiríase versicolor</i>	Imidazois Terbinafina Ciclopiroxolamina Triazóis	Tópica Tópica Tópica Oral

Dos produtos mais utilizados para ação tópica destacam-se os cremes e as loções, alguns dos quais podem ser adquiridos sem necessidade de prescrição médica. Geralmente, os pós antimicóticos não resultam tão bem no tratamento de infecções cutâneas, mas podem ser usados como auxiliares para pulverização do calçado, de modo a evitar o desenvolvimento fúngico, principalmente em sapatos e botas demasiado fechados, onde facilmente os pés transpiram o que otimiza o bem estar dos fungos, como já foi referido anteriormente. Habitualmente, os cremes são aplicados duas vezes por dia e o tratamento deverá prolongar-se pelo menos até algum tempo após a afeção ter desaparecido por completo, uma vez que quando se interrompe a aplicação do creme antes do tempo necessário para eliminação do fungo, a infeção poderá reaparecer.

Quando o tratamento tópico é ineficaz, é necessária a utilização de antifúngicos orais. Os fármacos mais usados nestas circunstâncias são os triazóis (itraconazol e fluconazol) e a terbinafina. A griseofulvina é, hoje, menos usada, tendo sido progressivamente substituída por estes novos antifúngicos (MAGINA 2006).

A par do tratamento antifúngico podem ser utilizados fármacos com propriedades anti-inflamatórias ou corticosteróides, para aliviar a dor e o prurido locais.

Manter as zonas afetadas limpas e secas ajuda a evitar o aparecimento de novas infeções fúngicas e otimiza o tratamento, principalmente em determinadas áreas da pele.

1.5. Fâneros (unhas) e Pele

Aquando da concepção de um novo produto com fins medicamentosos, é necessário ter em atenção todos os pontos que possam condicionar o alcance da eficácia máxima dos compostos ativos do mesmo. As características do organismo, como barreiras fisiológicas, alterações de pH, entre outros, não podem interferir com as características do produto, nem com a finalidade a que se destina.

Desta forma, será sempre necessário conhecer as características e condicionantes dos locais de ação dos novos medicamentos.

1.5.1. Unha

O termo unha (do latim *ungula unguis*) significa uma lâmina semitransparente que reveste a extremidade dorsal dos dedos. A unha tem uma espessura que pode variar de 0,5 a 0,75 mm.

As unhas integram o sistema tegumentar e são a estrutura presente na ponta dos dedos (última falange) da maioria dos vertebrados terrestres, assumindo formas e funções diferentes nas várias espécies animais. Nos humanos as unhas são reduzidas, arredondadas e quadradas, o que favorece a precisão na manipulação de objetos com a ponta dos dedos. De um modo geral, a unha tem a função de proteger e auxiliar a segurar objetos mais pequenos (manipulação fina), além de contribuir para a sensibilidade táctil e permitir o ato de arranhar.

É composta por queratina, uma proteína rígida que lhe confere as suas principais funções. A queratina forma várias camadas compactas fortemente aderidas entre si e à pele, até à sua extremidade. Estas camadas são secretadas por glândulas existentes na base da unha.

O aparelho ungueal é constituído por: lâmina ungueal, leito (zona onde a lâmina assenta), matriz ungueal (células germinativas que formam a lâmina ungueal), hiponíquio (margem livre da unha na porção distal), eponíquio (corresponde às cutículas da zona proximal) e dobras laterais e anterior. A lúnula corresponde à parte branca da unha junto às cutículas (Figura 7).

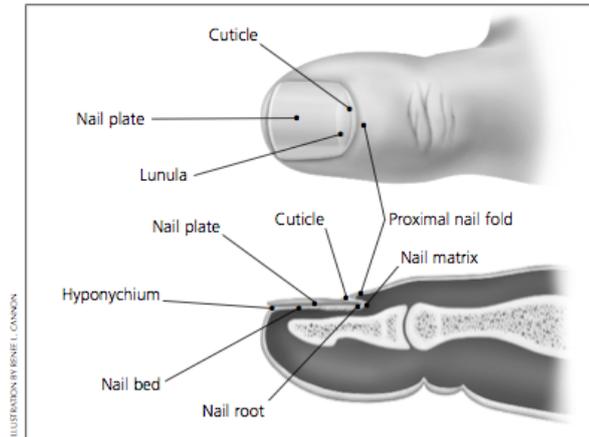


Figura 7 - Anatomia da unha (RODGERS e Bassler 2001)

Anatomicamente pode considerar-se a divisão da unha em três partes: raiz, corpo e bordo livre. A lâmina ungueal é a parte visível que se estende desde a raiz até ao bordo livre, fazendo portanto parte da zona do corpo da unha. A raiz está inserida na pele e é composta pela matriz (porção proximal da unha que cresce). A secção final das camadas de queratina até à ponta dos dedos, correspondem ao bordo livre. Esta margem livre da unha que se estende além do dedo não apresenta terminações nervosas e por isso não se sente dor ao cortá-la.

Das várias camadas que formam a unha, a mais profunda divide-se em duas camadas de células provenientes do leito epidérmico. A camada intermédia é constituída por fibra queratinizada e células vivas muito unidas entre si, sendo, por isso, a camada mais grossa. A camada visível, mais superficial apresenta células com a mesma origem das da camada intermédia, mas desvitalizadas que perderam o núcleo e acumularam queratina proveniente da matriz, em quantidade substancialmente superior à da camada intermédia.

O leito ungueal é constituído por células longitudinais epidérmicas, que se estendem da lúnula até ao hiponíquio, e é responsável pela cor rosa clara característica das unhas.

Já a cor esbranquiçada da lúnula ou meia lua é devida à presença de maior dispersão de colagénio, pois corresponde à parte visível da matriz. Quando ausente pode estar relacionada com a diminuição da sua função, comprometendo as características da unha, que deve ser forte e saudável.

O hiponíquio emite uma prolongação, que se adere com firmeza à superfície da lâmina ungueal, protegendo o aparelho ungueal e impedindo a existência de uma porta de entrada para infeções oportunistas por fungos e/ou bactérias.

O crescimento e o aspecto normal da unha dependem da integridade dos tecidos circundantes e da falange óssea, que vão contribuir para a correta formação do aparelho ungueal (Figura 8) (BERKER, André e Baran 2007).

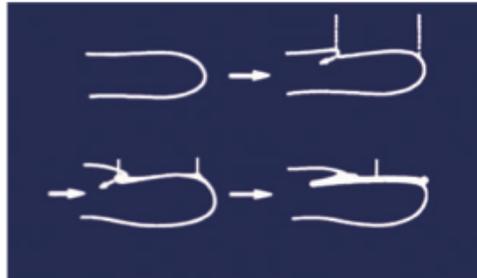


Figura 8 - Formação da lâmina ungueal a partir da zona proximal com origem na matriz e posterior invaginação (BERKER, André e Baran 2007).

O crescimento da lâmina ungueal faz-se no sentido distal, emergindo da região proximal da unha, o que só é possível pela presença de artérias digitais que levam a circulação aos dedos e asseguram a manutenção da circulação distal em condições de frio. As unhas crescem por volta de 0,1mm aproximadamente por dia, variando o crescimento com determinados fatores. Sabe-se, por exemplo, que as unhas crescem mais durante o dia que à noite, em homens do que em mulheres e também que o crescimento é mais rápido no Verão do que no Inverno. As unhas das mãos também crescem mais rápido do que as dos pés.

Por forma a exercer as suas funções eficazmente, a unha deve estar sempre na sua melhor condição, no entanto, as unhas são suscetíveis de desenvolver várias doenças e sofrer alterações que podem condicionar a sua fisiologia. A fragilidade ungueal é um dos problemas mais comuns, responsáveis por até 30% das patologias ungueais em mulheres adultas. Caracteriza-se por unhas macias e moles, mais finas que o habitual, flexionando e quebrando facilmente no bordo. A fragilidade anormal da unha é conhecida como hapaloníquia. Muito comum são as unhas encravadas, muitas vezes devido ao uso de sapatos apertados e traumatismos, principalmente nos dedos grandes dos pés (hálux). Existem também várias doenças que podem acometer as unhas, como se verificou anteriormente, levando a uma má formação e deficiente aspeto estético. Infeções, provocadas por fungos, ou bactérias, causam deformações nas unhas, vermelhidão e inchaço em volta delas. A OM constitui um sério problema, pois apesar de muito frequente, o diagnóstico é muitas vezes

tardio e o seu tratamento representa uma das principais dificuldades terapêuticas. Por vezes, mas com menos frequência, podem aparecer hemorragias subungueais, devido a roturas dos vasos sanguíneos nas unhas que podem causar linhas verticais ou manchas arroxeadas (Figura 9).



Figura 9 – Hemorragias nas unhas (BERKER, André e Baran 2007)

As verrugas, tumores benignos causados por infeção pelo HPV, também podem aparecer nas unhas, pois podem crescer em quaisquer dos tecidos moles ao redor das unhas, podendo ser tratadas com ácidos de aplicação tópica, quimioterapia, irritantes e imunoterapia.

A lâmina ungueal humana é uma estrutura bastante complexa. Apesar de fina, a unha tem 80-90 camadas de células mortas. A quantidade relativamente elevada de água na lâmina da unha, de 10-30%, e, simultaneamente, o baixo teor de lípidos em comparação com o estrato córneo da pele, suporta a teoria de que a lâmina ungueal humana se comporta como um gel hidrófilo membranar. É a sua complexidade e estrutura normal que tornam o tratamento mais difícil (VEJNOVIC, Simmler e Betz 2010). A velocidade do crescimento das unhas é também uma razão pela qual o tratamento das suas doenças é tão demorado, resultando em baixa adesão do doente à terapêutica, que geralmente o abandona, tornando as doenças das unhas crónicas. Assim, para além da pesquisa de novos compostos ativos, também novas formulações farmacêuticas têm sido desenvolvidas de modo a aumentar a eficácia de algumas moléculas já comercializadas. Modelos *in vitro* estão também em desenvolvimento; eles permitem avaliar a eficácia de fármacos, apoiando o tratamento da OM (LUSIANA, Reichl e Muller-Goymann 2013) e de outras doenças que afetam as unhas.

Para evitar a procriação de bactérias e fungos e os problemas que mais vulgarmente afetam as unhas, elas devem estar sempre limpas e secas. Também não se devem roer, pois

pode causar crescimento irregular, e a unha humedecida é favorável ao desenvolvimento da infecção.

1.5.2. Pele

A pele, cútis ou tez, é o órgão (LANCEROTTO, et al. 2011) que reveste e molda o corpo e assegura as relações entre o meio interior e exterior. Anatomicamente, é um órgão integrante do sistema tegumentar, juntamente com o cabelo, pêlos, unhas e glândulas (sudoríparas e sebáceas).

A pele é o revestimento externo, considerado o maior órgão do corpo humano e o mais pesado; consiste num grande órgão estratificado, que num adulto médio pesa cerca de 3,6 kg, excluindo a gordura. Constitui entre 10% a 15% da totalidade do corpo, cobrindo uma superfície superior a 20000cm² e apresentando variadas funções e propriedades (LACHMAN, Lieberman e Kanig 2010).

É a pele que determina o aspeto ou aparência, estabelecendo as características mais visíveis de cada animal. No homem individualiza-o, sendo as impressões digitais o mais alto expoente dessa caracterização e especificidade. Tem, pois, funções de aparência como a moldagem do corpo, expressão de personalidade e imprime carácter sexual e racial.

Para além das funções de aparência que incluem a moldagem do corpo, a pele tem muitas outras funções. A principal é, sem dúvida, a proteção do organismo das ameaças externas físicas, consistindo numa barreira de defesa microbiana, radioativa, química, térmica e elétrica, dotada de resistência, flexibilidade ou plasticidade, impermeabilidade e com capacidade de renovação. Por isso mesmo, também protege o ser humano da força mecânica e atrito. Uma das funções vitais da pele é a proteção contra a desidratação, já que o corpo humano é composto principalmente por água. Sendo os seres humanos animais terrestres, necessitam de se proteger contra a evaporação excessiva e desidratação, situações inevitáveis em meios secos e quentes. Permite regular a temperatura corporal, por exemplo pela presença de tecido adiposo subcutâneo, que protege contra o frio, uma vez que a gordura é má condutora de calor, e pela ação de glândulas sudoríparas, que segregam líquido aquoso, cuja evaporação diminui a temperatura superficial do corpo, entre outros mecanismos. Permite ainda a síntese e metabolismo, como a produção de vitamina D (essencial para o metabolismo do cálcio e portanto à formação e manutenção saudável dos ossos), bem como a regulação hemodinâmica. A pele é ainda um órgão importante do

sistema imunitário, alberga diversos tipos de leucócitos e células portadoras de antigénio (histiócitos ou células de Langerhans). Na recepção de informação de estímulos externos, nomeadamente, dor, sensação táctil e térmica, atua como órgão sensorial, uma vez que apresenta numerosas terminações nervosas, algumas livres, outras em comunicação com órgãos sensoriais especializados, como células de Merckel e folículos pilosos (PRISTA, Bahia e Vilar 1992).

Do ponto de vista anatómico a pele possui diversas camadas histológicas, mas em geral, é descrita em termos de três camadas de tecidos: a epiderme, a derme e a camada adiposa subcutânea ou hipoderme (Figura 10).

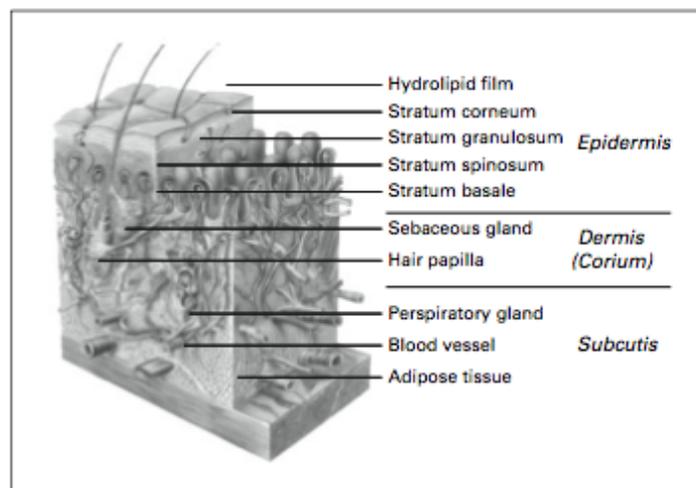


Figura 10 - A pele humana esquematicamente (TROMMER e Neubert 2006).

A epiderme, cuja espessura varia consoante a localização, é formada, de fora para dentro, por células anucleadas e queratinizadas (estrato córneo) e por várias fiadas de células vivas, incluindo a camada basal. É constituída por epitélio pavimentoso estratificado. Entre o estrato córneo e a camada basal existem os estratos granuloso e espinhoso.

O estrato córneo consiste em células compactadas, mortas, queratinizadas, que formam camadas estratificadas com uma densidade de 1,55. Devido à natureza densa do estrato córneo, os valores dos coeficientes de difusão neste tecido são mil ou mais vezes menores do que em qualquer outro tecido da pele, o que resulta em grande resistência e impermeabilidade geral. Desta forma, o estrato córneo é uma barreira que limita a velocidade e restringe os movimentos de entrada e saída de substâncias químicas (LACHMAN, Lieberman e Kanig 2010).

Este estrato exhibe diferenças regionais de espessura ao longo do corpo; no estado seco a composição é de aproximadamente 75 a 85% de proteína, 15 a 20% de lípidos e 15% de água, numa estrutura ordenada, embora o conhecimento da composição química desta barreira seja limitado. Sabe-se também que, apesar dos lípidos de superfície oferecerem pouca resistência à passagem de compostos, as variações na permeabilidade da membrana biológica, dependem fortemente da natureza específica ou distribuição do lípido constituinte na membrana celular (LACHMAN, Lieberman e Kanig 2010).

A seguir ao estrato córneo encontram-se as camadas metabolicamente ativas da epiderme, sendo a camada basal ou germinativa a que se localiza imediatamente acima da derme. As células epidérmicas iniciam a sua jornada mitótica em direção ascendente até à superfície e tornam-se achatadas e diminuem de tamanho à medida que morrem lentamente devido à falta de oxigénio e de nutrição (LACHMAN, Lieberman e Kanig 2010).

A epiderme assenta sobre a derme ou *corium*, constituída por tecido conjuntivo. Por sua vez, este tecido é constituído por células, que para além de fibroblastos, mastócitos, macrófagos e histiócitos, contemplam células migratórias, como os leucócitos e plasmócitos. Os fibroblastos são as células envolvidas na produção dos componentes da matriz extracelular. Para além dos elementos celulares, a derme também é constituída por compostos extracelulares, nomeadamente fibras e substância intersticial. De um modo geral a derme contém essencialmente cerca de 80% de proteína numa matriz de mucopolissacáridos, iões, água, apresentando uma espessura de aproximadamente 3 mm e constituindo a principal massa da pele.

A derme é subdividida em duas camadas: a camada papilar em contato com a epiderme, formada por tecido conjuntivo frouxo, e a camada reticular, constituída por tecido conjuntivo denso, onde predominam as fibras colagenosas, como o colagénio e a elastina.

Contidos e suportados no interior da derme encontram-se numerosos vasos sanguíneos que nutrem a epiderme, vasos linfáticos e também os nervos e as células sensoriais a eles associados (Tabela 5), bem como todos os acessórios epidérmicos, tais como os folículos pilosos, as glândulas sebáceas e as glândulas sudoríparas.

Tabela 5 - Células sensoriais que constituem a derme

Células de Merckel	Sensíveis ao tacto e à pressão
Órgãos de Ruffini	Sensíveis ao calor
Corpúsculos de Vater-Pacini	Sensíveis à pressão
Corpúsculos de Meissner	Deteção de pressões de frequências diferentes
Corpúsculos de Krause	Sensíveis ao frio
Terminações nervosas livres	Com dendrites livres sensíveis à dor e temperatura
Folículos pilosos	Com vários tipos de terminações nervosas associadas

Ligada à derme, mais internamente, existe uma camada de tecido subcutâneo, habitualmente adiposo (LANCEROTTO, et al. 2011) – hipoderme. É neste tecido que surgem os diversos apêndices cutâneos, como os folículos pilosos, glândulas sebáceas e sudoríparas, que atravessam as diversas camadas histológicas e surgem à superfície (PRISTA, Bahia e Vilar 1992).

Relativamente às glândulas sudoríparas, estas dividem-se em glândulas do tipo écrino e apócrino e encontram-se largamente distribuídas em todas as superfícies do corpo. As glândulas écrinas encontram-se particularmente concentradas nas palmas das mãos e solas dos pés, sendo a sua principal função o controlo do calor. Já as glândulas apócrinas encontram-se localizadas nas axilas, nas regiões anogenitais e à volta dos mamilos. Estas são glândulas tubulares enroladas cerca de dez vezes e maiores que as glândulas écrinas; existem em toda a espessura da derme.

Uma complexa rede vascular, composta por arteríolas, vénulas e capilares, surge desde a hipoderme, atingindo o limiar da camada basal epidérmica.

Existem ainda nesta camada mais interna da pele, células nervosas sensoriais.

Atendendo à estrutura da pele, os medicamentos de ação tópica, devem ser formulados de modo a assegurar que os compostos ativos atravessam adequadamente as diferentes camadas de tecido, de modo a exercer a sua eficácia máxima, não devendo as diferentes barreiras biológicas constituírem um entrave à ação terapêutica. A entrega de API, sobre e através da pele, continua a ser uma área de desafio para os farmacêuticos. Deve-se em grande parte às excelentes propriedades de barreira deste órgão, cuja evolução permitiu a sobrevivência dos seres humanos em ambientes secos. Apesar da pele constituir um órgão multicamadas, como antes referido, é a camada mais externa, o estrato córneo, que exerce a maior ação de barreira à permeação dos fármacos (LANE 2013).

Geralmente o objetivo da terapia dermatológica é a obtenção da ação terapêutica desejada, em áreas específicas do tecido epidérmico. Enquanto certos compostos tópicos, como os emolientes, alguns antimicrobianos e os desodorizantes atuam principalmente na superfície da pele, a área-alvo, na maioria das perturbações dermatológicas, reside na epiderme viável ou parte superior da derme, o que requer penetração da pele por difusão ou absorção percutânea (LACHMAN, Lieberman e Kanig 2010).

As várias camadas de células epidérmicas diferenciadas e queratinizadas que constituem o estrato córneo estão separados por um domínio lipídico intercelular, apresentando-se os queratinócitos organizados no interior da matriz lípido – proteica. Os compostos ativos podem atravessar o estrato córneo através das células ou através dos poros (Figura 11) (TROMMER e Neubert 2006).

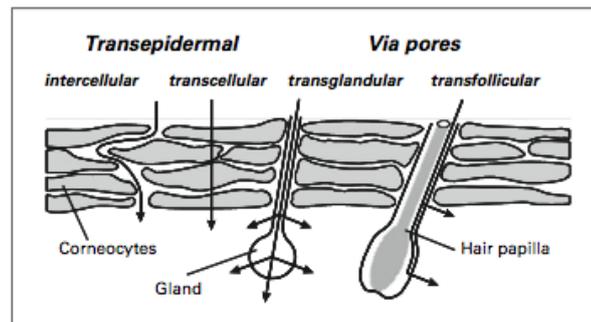


Figura 11 - Vias de penetração dérmica (TROMMER e Neubert 2006)

Por via celular as moléculas podem atravessar as células intercelularmente ou transcelularmente. Por via dos poros, as moléculas podem usar os folículos pilosos ou as glândulas, como porta de entrada nas camadas dérmicas. A permeação através das glândulas sudoríparas e folículos pilosos é menos significativa, uma vez que eles apenas ocupam 0,1% da área total da superfície da pele humana. No entanto, a entrega de fármacos por esta via pode ser importante para a permeação de compostos que se difundem lentamente e de substâncias de elevado peso molecular, ou para facilitar o transporte através da pele de moléculas carregadas, após a aplicação de uma pequena corrente elétrica. Além disso, o percurso através dos poros pode contribuir para a rápida difusão dos compostos nas fases iniciais de difusão (LANE 2013). Embora as moléculas atravessem as células, a via de permeação predominante é através dos espaços intercelulares.

Os processos que podem ocorrer após a aplicação tópica de uma formulação na pele envolvem inicialmente a libertação do fármaco a partir do veículo, seguida de partilha no estrato córneo. As moléculas são distribuídas por difusão, como resultado de um gradiente

de concentração, antecedido de um processo de separação para a epiderme viável, e após difusão através da epiderme viável para a derme. Assim, a estrutura físico química influencia diretamente a permeação cutânea, pelo que a utilização de promotores químicos de penetração tem sido desenvolvida, por forma a potenciar a entrega dos fármacos nos locais alvo. Claramente, a natureza e o propósito da formulação vai influenciar a seleção do potenciador: as formulações tópicas são destinados para a ação local, veiculando o fármaco para as camadas exteriores da pele, enquanto que o objectivo de uma formulação transdérmica é administrar o fármaco para a circulação sistémica. Os promotores usados em produtos transdérmicos são muito mais diversificados e implicam maior tempo de contato do que os usados para ação local. A sua ação esta diretamente relacionada com a capacidade de interagir com os lípidos da pele, pelo que os promotores de permeação são selecionados e desenhados atendendo às características de solubilidade do fármaco na pele, que deve ser aumentada por ação do promotor. A solubilidade da substância ativa no promotor, o tempo de residência do promotor na pele e a solubilidade do API no veículo, parecem também ter influência sobre a concentração final do fármaco na pele *in vivo*. De um modo geral, os promotores de permeação atuam por um mecanismo de difusão - partição – solubilidade, influenciando e modificando a difusão através da pele que intercalam com as bicamadas lipídicas, perturbando a organização normal dos lípidos. O promotor ideal deve ser farmacologicamente inerte, não-tóxico, não-irritante, não alérgico, estável e esteticamente aceitável na formulação. Assim, o desenvolvimento de novos promotores deve ser bem desenhado, uma vez que a irritação é uma consequência da sua ação por alterar a função de barreira da pele, o que deve ser diminuído.

Considerando o exposto anteriormente, os novos medicamentos destinados a aplicar na pele, devem ser formulados atendendo às características fisiológicas das zonas que pretendem tratar, por forma a exercerem comprovadamente a sua eficácia máxima. Várias estratégias para melhoria de permeação de compostos ativos têm sido relatados na literatura, por forma a otimizar a sua entrega dérmica ou transdérmica (LANE 2013).

2

**Necessidade de formulações de ação tópica
antifúngica**

Atendendo à elevada incidência das infeções fúngicas e ao desconforto da sua presença, não só patológico, mas também estético, torna-se importante desenvolver formulações de aplicação rápida e simples, que comecem a travar a sua progressão e que melhorem o aspeto da zona onde está a ocorrer o desenvolvimento fúngico. É também importante que os novos produtos desenvolvidos com esta finalidade apresentem os menores efeitos indesejáveis possíveis, pelo que antifúngicos de amplo espectro e fungicidas devem causar poucos efeitos adversos.

Devido ao fato dos antifúngicos disponíveis no mercado não satisfazerem a necessidade médica por completo, a busca por novos fármacos tem sido intensificada, resultando na descoberta de fármacos com mecanismo de ação inovador. Sendo as infeções fúngicas cutâneas e as onicomicoses o tipo de micoses mais comuns na população, os fármacos antifúngicos mais procurados giram em torno de formulações tópicas de fácil aplicação por parte do doente e de rápida ação, devendo assim aumentar a adesão à terapêutica.

2.1. Objetivos do trabalho

Face ao exposto anteriormente, pretende-se, com este trabalho, o desenvolvimento de novas formulações farmacêuticas de ação tópica derivadas de produtos naturais, com potencial ação antifúngica, adequadas à administração dos compostos ativos do extrato (API) em estudo. Em particular, estudou-se um subproduto da indústria corticeira, um granulado de cortiça, com potencial efeito antifúngico.

Considerando a ação terapêutica deste (antifúngico), os alvos da formulação são a pele e fâneros (unhas), visto serem das zonas mais afetadas por fungos, pelo que, e atendendo ao local de ação do API, considerou-se relevante o desenvolvimento de um creme e de um verniz.

Para além das características tecnológicas das formulações a desenvolver, impõe-se adequar as suas propriedades cosméticas.

2.1.1. Objetivos específicos

A presente dissertação desenvolveu-se tendo em vista os seguintes objetivos específicos:

- Desenvolvimento de formulações de ação tópica na unha com potencial ação antifúngica – preparação de um verniz;
- Desenvolvimento de formulações de ação tópica na pele com potencial ação antifúngica – preparação de um creme;
- Avaliação da estabilidade das formulações obtidas;
- Controlo de pontos críticos no processo de produção das formulações farmacêuticas.

3

**Desenvolvimento de formulações
farmacêuticas de ação tópica-Requisitos**

O desenvolvimento de formulações farmacêuticas deve ter sempre em conta as necessidades dos doentes a que se destinam, bem como a finalidade e o objetivo para o qual é proposto de acordo com a ICH.

Assim, e conforme submissão regulamentar, o desenvolvimento farmacêutico (*Pharmaceutical Development*) deverá incluir, pelo menos, os seguintes requisitos:

- Definir o objetivo e características do produto, como via de administração, forma galénica, dosagem, biodisponibilidade e estabilidade, assegurando a sua qualidade, segurança e eficácia;
- Identificar características de qualidade da substância ativa, excipientes, material de acondicionamento e outros;
- Selecionar o tipo e quantidade de excipientes de forma a obter um produto acabado com a qualidade desejada;
- Determinar pontos que possam ser críticos na qualidade do produto acabado, de forma a que possam ser estudados e controlados;
- Selecionar um processo de fabrico adequado e reprodutível;
- Definir estratégias de controlo.

Para cada uma das formas farmacêuticas foi considerada uma formulação simples, reprodutível, estável e cosmeticamente aceitável. Foram também selecionados processos de fabrico simples e reprodutíveis para ambas as formulações.

4

**Desenvolvimento de um verniz de aplicação
tópica na unha**

4.1. Introdução

Os vernizes de aplicação na unha constituem o maior grupo de preparações para manicura e pedicura, desde os usados para embelezar a unha com as mais variadas cores e desenhos, até aos produtos medicamentosos, usados com finalidade de proteger e tratar alterações e patologias na unha. Podem também evitar a sua possível progressão ou transmissão (SCHLOSSMAN 1993).

Apesar do tratamento de ação tópica na unha ser preferível, tem de ultrapassar o seu principal obstáculo, ou seja, a construção perfeita da unha, que serve como uma barreira para penetração de fármacos. Este é provavelmente o maior desafio para o tratamento tópico em comparação com qualquer outra via de administração. Nestes sistemas a velocidade e quantidade de API libertada a partir das formulações tópicos, para a lâmina da unha, deve ser controlada, por forma a manter uma quantidade de fármaco suficiente durante o período de tratamento. Para este fim, excipientes e veículos inovadores, tais como transfersomas e nanoemulsões também têm sido investigados (LUSIANA, Reichl e Muller-Goymann 2013).

Vernizes ou esmaltes utilizados com fins terapêuticos, constituem sistemas trans-ungueais, formulados para permitir mais tempo de liberação e ação prolongada do princípio ativo na unha infetada (ELEZOVIC, et al. 2010). Uma penetração ideal deve potenciar não só a entrega do fármaco através da lâmina ungueal, mas também abrir novas possibilidades para o tratamento de locais alvo vizinhas, atingindo a circulação sistémica (VEJNOVIC, Simmler e Betz 2010). Eles devem apresentar características como: serem de fácil aplicação, secar e endurecer rapidamente, serem impermeáveis à água e boa adesão. Devem também ser lustrosos para dar brilho à unha, elásticos, resistentes a lascagem e à abrasão. Dos principais componentes de um verniz devem fazer parte polímeros formadores de película e plastificantes, compostos responsáveis pela dureza e brilho e solventes. Por forma a melhorar as características finais para uma melhor aceitação cosmética, podem também ser adicionados compostos que modifiquem ou alterem a coloração.

As matérias primas não podem ser tóxicas e devem ser dermatologicamente aceitáveis. Para isso, devem ser usadas concentrações tais que, quando aplicados os produtos no substrato, eles sejam inócuos para a unha. Embora a água tenha um papel crucial na permeação de fármacos através da placa da unha, devido à sua capacidade de hidratação da unha e de indução de mudanças conformacionais das fibras de queratina, as

formulações com etanol não influenciam significativamente os coeficientes de permeabilidade, em comparação com formulações de água pura. Um potenciador eficaz da permeação de fármacos através da membrana da unha queratinizada, pode ter importância clínica não só no tratamento das doenças da unha, mas também no tratamento de locais alvo adjacentes, por exemplo, se a circulação sistêmica for atingida (VEJNOVIC, Simmler e Betz 2010).

Os vernizes são formulações farmacêuticas capazes de formar um filme polimérico que permite a incorporação e a consequente liberação de fármacos na unha. Utilizam-se frequentemente compostos derivados de celulose, como a nitrocelulose e resinas, acrilatos e vinilos em pequenas quantidades. A aplicação destes compostos em solventes adequados, proporciona a base de uma laca na unha, que por secagem forma um filme. Habitualmente esta película formada é frágil e sem brilho, pelo que é necessária a utilização de um plastificante adequado para dar a flexibilidade ideal do filme obtido. Relativamente aos efeitos de plastificantes em filmes para verniz, foi desenvolvido o conceito de “fluxo interno”: é uma área que se desenvolve por baixo da superfície da película em que os componentes do filme permanecem dinâmicos e móveis, durante o processo de formação de película. O período de tempo durante o qual o filme mantém esse status está diretamente relacionada com o equilíbrio das resinas, plastificantes, polímeros e solventes utilizados. Quanto mais tempo o “fluxo interno” persistir, maior é a capacidade de desgaste do esmalte (MUI, et al. 2000).

Neste tipo de preparações farmacêuticas a manutenção das características de viscosidade são muito importantes, uma vez que o produto final deve apresentar dureza adequada, por forma a manter-se resistente e não comprometer a ação terapêutica, mas também não pode ser demasiado espesso, dificultando a aplicação e o tempo de secagem. Para além disso não pode comprometer a eficaz fixação dos compostos ativos no substrato, a unha. A viscosidade é uma propriedade que varia com o grau de polimerização dos compostos selecionados. O ponto de ebulição dos solventes também influencia a viscosidade de uma solução de laca, pois quanto menor for o ponto de ebulição, menor é a viscosidade da solução e melhor o poder de cobertura.

Assim, a seleção dos solventes utilizados como a parte volátil da preparação obtida é importante, e deve consistir num solvente ou numa mistura adequada, de modo a que em relação à taxa de evaporação, evite alterações que possam provocar a precipitação dos polímeros, devendo, para isso, secar rapidamente quando aplicados em forma de película sobre a unha.

O verniz obtido deverá consistir numa forma farmacêutica fluida, mas com comportamento pseudoplástico, que surge em soluções de polímeros e na maioria dos sistemas semissólidos que contêm componentes poliméricos, em consequência da existência de interações intermoleculares entre as cadeias dos polímeros. Estas preparações são consideradas como sistemas que têm a capacidade de escoamento, sem que retenham a sua forma quando não confinadas a um recipiente.

4.2. Materiais

Neste trabalho foram utilizadas amostras de extratos hidro-alcoólicos derivados de granulado de cortiça, concentrados em evaporador rotativo, a 40°C, e posteriormente liofilizados, que foram designados de BIC19*. Utilizaram-se extratos a 1%, na preparação dos quais, o liofilizado foi dissolvido em etanol 45% e água 55%, apresentando cor acastanhada.

Na preparação do verniz medicamentoso, os excipientes constituintes da formulação farmacêutica devem garantir a fixação do API, de modo a assegurar a eficácia máxima do produto e não devem interferir com o extrato, permitindo obter no final preparações estáveis.

Um dos excipientes utilizados na preparação do verniz foi Eudragit® E100 (Anexo 1). O Eudragit E100 é a designação comercial de um polímero derivado metacrílico. Apresenta-se sob a forma de grânulos incolores corados de amarelo com um odor semelhante ao da amina e tem como finalidade de utilização recomendada ser um excipiente farmacêutico e cosmético para aplicação dérmica. Normalmente é utilizado para controlo da libertação dos princípios ativos.

Também se utilizou Triacetina (Anexo 2). A Triacetina é muito utilizada na indústria farmacêutica no revestimento de comprimidos, com a função de plastificante. Trata-se de um excipiente seguro e consiste num líquido límpido e incolor.

A Hidroxipropilmetilcelulose (Anexo3), também conhecida por hipromelose é uma substância produzida a partir da celulose, sendo um dos compostos presente em muitos medicamentos. Tem diversas utilizações enquanto excipiente, nomeadamente como polímero controlador da velocidade de cedência de fármacos em formas sólidas orais (libertação controlada por filme polimérico ou em sistemas de matriz hidrofílica, entre outros). Também atua como agente viscosificante. É um polímero semissintético, inerte e viscoelástico, podendo ser utilizado como um lubrificante oftálmico.

Como solventes, usaram-se acetatos de etilo (Anexo 4) e de butilo (Anexo 5), etanol (Anexo 6) e água destilada (preparada internamente, por sistema Millipore). O acetato de etilo tem comprovada utilização na preparação de produtos farmacêuticos, em particular tópicos. É comum utilizá-lo como solvente de vernizes em alternativa à acetona. Por sua vez, o acetato de butilo é muito indicado como solvente em lacas, tintas e vernizes.

* Nota de confidencialidade

4.3. Métodos

4.3.1. Ensaios de solubilidade e estabilidade do extrato

Os compostos ativos constituem um extrato com características de solubilidade particulares, uma vez que não são solúveis nem só em água, nem só em etanol. A formulação final terá as características de uma solução orgânica adequada para aplicação tópica na unha, mas que permita a completa dissolução do extrato. Esta forma farmacêutica implica a utilização de uma forma física tipo solução ou suspensão desde que se controle adequadamente o tamanho da partícula e a sua estabilidade. Assim, o estudo inicial envolveu a avaliação da solubilidade e compatibilidade do extrato com os solventes água e etanol.

Para isso, utilizaram-se várias amostras de extrato que se misturaram com os diferentes solventes, em ensaios nos quais se fizeram variar as quantidades adicionadas de extrato e solventes.

4.3.2. Ensaios de solubilidade e estabilidade do Eudragit® E100

Atendendo ao fato de que se pretende obter um verniz de aplicação tópica na unha, a formulação final, deve garantir a rápida secagem, adesão ao substrato (unha) e resistência durante o período de utilização. Foi usada uma base polimérica conseguida a partir de derivados metacrílicos, que dão as características ideais ao verniz, uma vez que permitem obter uma preparação de textura uniforme. Para esta finalidade selecionou-se o polímero Eudragit® E100.

Começou-se por avaliar a solubilidade do Eudragit® E100, nos acetatos de etilo e butilo e em água, solventes que fizeram parte da preparação inicial das amostras do extrato. Apesar dos resultados apresentarem características interessantes de solubilidade nos solventes orgânicos separadamente, acabou por se selecionar a preparação em que o Eudragit® E100 se conseguiu dissolver numa mistura contendo os dois solventes orgânicos, por apresentar os melhores resultados, de todas as preparações obtidas (Tabela 6).

Tabela 6 - Solventes usados nos ensaios de solubilidade e estabilidade do Eudragit® E100

Reagentes	Quantidade
Eudragit® E100	20g
Acetato de Etilo	70mL
Acetato de Butilo	30mL

4.3.3. Ensaios de adição do plastificante

Para conseguir adequada coalescência de partículas, utilizou-se um plastificante, a triacetina, que não só dá brilho ao verniz, como também permite a fixação dos compostos ativos na unha.

Assim, à preparação obtida do ponto anterior, adicionaram-se, 2mL de triacetina. Após várias tentativas de adição de triacetina em diferentes quantidades, conseguiu-se determinar a quantidade exata, não alterando as características da preparação obtida e garantindo-se a eficácia do plastificante.

4.3.4. Ensaios de secagem e fixação da preparação obtida

Por forma a avaliar o tempo de secagem da preparação obtida, aplicou-se a amostra em vidros de relógio e analisou-se o tempo que demorava a secar, bem como a sua capacidade de adesão (Figura 12).

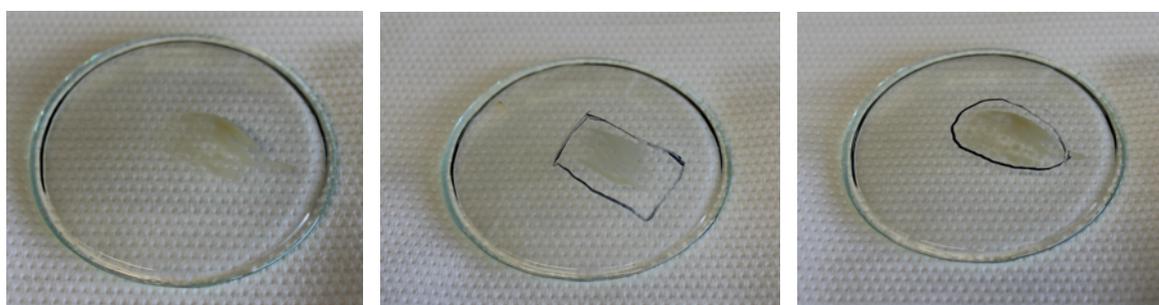


Figura 12 - Avaliação da adesão e tempo de secagem da preparação obtida

4.3.5. Ensaios de adição do viscosificante

Por análise do tempo de secagem, e por forma a diminuir a fluidez da preparação obtida, para garantir a fixação dos compostos ativos, adicionou-se hipromelose, derivado hidrodispersível da celulose (hidroxipropilmetilcelulose).

Fizeram-se vários ensaios, por variação da concentração de hipromelose, de modo a definir a quantidade ideal que permite otimizar a viscosidade e assim aumentar a aceitação por facilidade de aplicação e tempo de secagem. Assim, prepararam-se quatro soluções de hipromelose com concentrações diferentes: A, B, C e D. O solvente utilizado foi a água destilada.

- A - Hipro1,4%
- B - Hipro1,5%
- C - Hipro1,6%
- D - Hipro1,7%

As preparações obtidas por variação da concentração de hipromelose foram adicionadas ao extrato para avaliação de estabilidade (Figura 13) e aplicadas em placas de vidro, por forma a avaliar a influência da concentração de hipromelose na adesão e tempo de secagem (Figura 14).

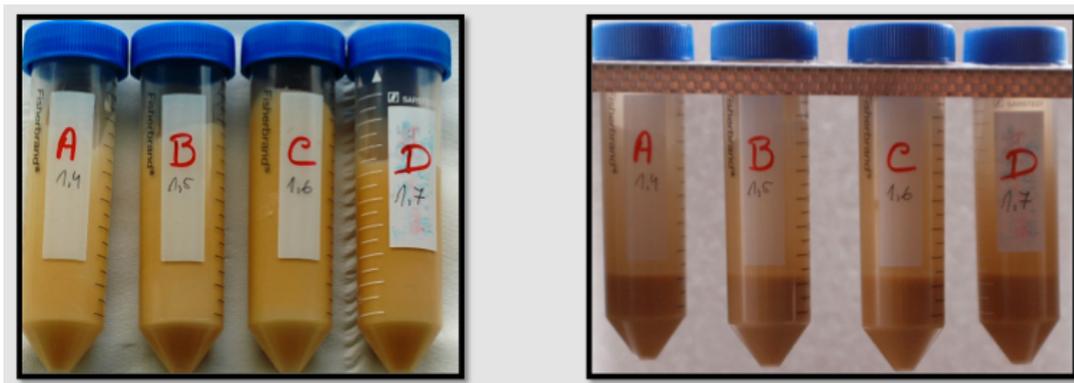


Figure 13 - Preparações de hipromelose adicionadas ao BIC19

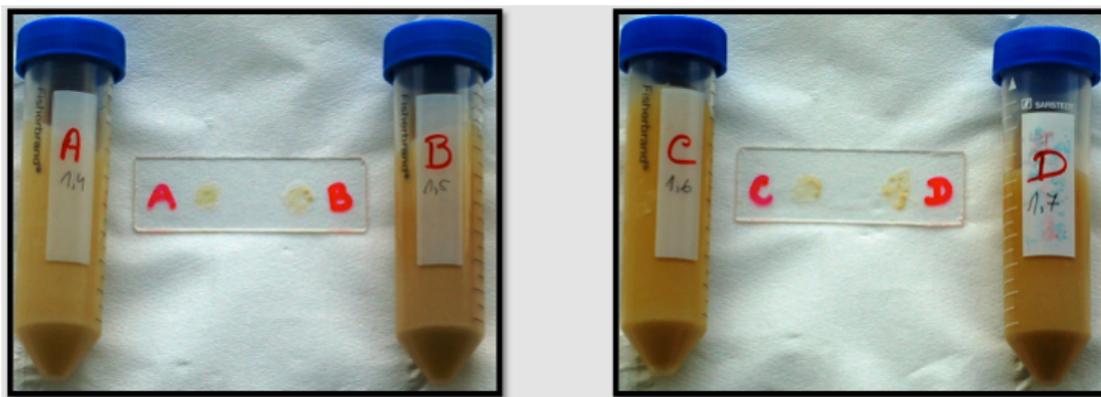


Figura 14 - Preparações de hipromelose analisadas em placas de vidro

4.3.6. Formulação final

A formulação final foi obtida pela adição ao extrato, das preparações obtidas conforme descrito nos pontos anteriores (Tabela 7).

Tabela 7 - Formulação final

Componentes	Quantidade
Eudragit® E100	20,0g
Acetato de Etilo	70,0mL
Acetato de Butilo	30,0mL
Triacetina	2,0mL
Hipromelose	1,4g
Água destilada	100,0mL
Extrato	xxmL*

4.3.7. Acondicionamento

O acondicionamento do verniz medicamentoso foi feito em frascos de vidro com aplicador apropriado para aplicação tópica na unha (Figura 15).

* Nota de confidencialidade



Figura 15 - Preparação final acondicionada

4.4. Resultados e Discussão

4.4.1. Características de solubilidade do extrato que condicionam a estabilidade da formulação final

O extrato para se manter estável, tem de estar solubilizado numa mistura de água e solventes orgânicos. A solubilidade foi obtida após uma dissolução sequenciada do extrato, em água e depois em etanol, com uma centrifugação intercalar. Deve manter-se uma mistura proporcional de ambos os tipos de solventes, por forma a garantir a estabilidade em solução do BIC19. Assim, nas preparações farmacêuticas realizadas, verificou-se que o extrato, quando adicionado a preparações com maior concentração em água não se consegue manter estável, formando-se conseqüentemente fases de separação.

A adição de Eudragit® E100 à formulação, permitiu obter as características ideais, uma vez que dá origem a uma preparação com textura homogênea, dos compostos ativos dissolvidos em meio líquido. Dos ensaios de solubilidade realizados para o Eudragit® E100, rapidamente se verificou que este não é solúvel em água. Quando adicionado aos solventes orgânicos, verificou-se que o Eudragit® E100 solubiliza e apresenta características de homogeneidade nos acetatos de etilo e butilo separadamente. No entanto, estas preparações tornaram-se menos interessantes quando feitos ensaios para avaliar o tempo de secagem e aderência em vidros de relógio, com o objetivo de avaliar a capacidade de fixação dos compostos ativos quando aplicados na unha, uma vez que as características de viscosidade e aderência não se mostraram as melhores. Para além disso, verificou-se que o Eudragit® E100 solubilizou mais facilmente na mistura dos dois solventes orgânicos, do que quando fazendo a adição dos mesmos separadamente. Assim, para a dissolução do Eudragit® E100, utilizou-se uma mistura de dois solventes orgânicos, nomeadamente acetato de etilo e acetato de butilo, com características de rápida evaporação e, conseqüentemente rápida secagem da preparação aquando da sua aplicação.

A triacetina, usada na preparação como plastificante, apresenta características aceitáveis de solubilidade, não interferindo com a estabilidade e o aspeto da preparação farmacêutica, quando em solução. Em relação à preparação obtida, após a adição da triacetina, verificou-se após aplicação em vidro de relógio, que a adesão, agora melhorada, poderia ser potenciada se a preparação final ficasse mais viscosa. Assim, a hipromelose foi usada como viscosificante. Atua também como um agente intensificador do brilho.

4.4.2. Características organolépticas das formulações desenvolvidas

As várias preparações finais obtidas apresentaram-se como soluções límpidas, de cor bege-dourado e cheiro característico de verniz. Após aplicação, o verniz aderiu perfeitamente à superfície, por rápida secagem, o que permite a fixação dos compostos. Forma uma película com tonalidade dourada quase incolor e com brilho agradável.

Tratando-se de um verniz, foi necessário adequar as características estéticas ao produto final. Verificou-se que não seria necessário adicionar nenhum descolorante, nacarante ou outro à preparação final, uma vez que esta apresenta uma cor final que não interfere esteticamente com o aspeto da unha e mantém um brilho agradável.

4.4.3. Características da textura das formulações desenvolvidas

Neste tipo de formulações é importante avaliar o comportamento reológico das formulações finais.

Relativamente ao ensaio de adição do viscosificante, a obtenção de preparações contendo hipromelose em concentrações diferentes, permitiu obter quatro preparações finais com viscosidades diferentes. Das quatro preparações obtidas, todas elas apresentaram características de viscosidade aceitáveis para a finalidade a que se destinam. Estas preparações ficaram armazenadas por algum tempo e foram analisadas pela empresa produtora dos resíduos. Após o tempo de reserva e armazenamento, conclui-se que o verniz manteve as suas características de viscosidade e escoamento.

A preparação final obtida da junção do extrato, com os diferentes excipientes apresenta características ótimas e muito bem aceites, para além do aspeto também de viscosidade. São preparações líquidas que após aplicação aderem e secam rapidamente. A análise de preparações placebo, demonstra que não ocorre alteração do parâmetro viscosidade, desde que a embalagem seja conservada fechada. Não existe portanto evidência de alterações com o período de armazenagem.

4.5. Conclusões

Para a preparação do verniz realizaram-se seis formulações finais, pela junção da amostra do extrato com os diferentes excipientes, para as quais se obtiveram resultados semelhantes. Tendo-se preparado vários lotes e, atendendo aos resultados obtidos, confirmou-se que houve reprodutibilidade para as características de solubilidade, características organolépticas e de textura das mesmas. Perante estes resultados, conclui-se que o extrato é compatível e estável com os vários excipientes. Também os vários excipientes utilizados são compatíveis, não havendo separação de fases ou outras alterações, quando adicionados entre si.

Nos vários passos do processo de obtenção da nova formulação farmacêutica, os excipientes foram usados em várias quantidades e de acordo com ensaios de variação de uns, mantendo os outros constantes. Estas alterações permitiram concluir quais e em que quantidades os excipientes devem ser adicionados à preparação, por forma a proporcionar as condições ideais de fabrico e as melhores características de secagem, adesão e resistência aquando da aplicação no substrato, a unha. Assim e, após vários ensaios foi possível concluir-se quais e em que quantidades devem ser mantidos os vários excipientes, por forma a ser obtida a melhor preparação farmacêutica com ação antifúngica na unha, derivada de extrato de granulado de cortiça.

A triacetina foi um plastificante bem escolhido, uma vez que para além de não interferir com o aspeto da preparação, dá o brilho adequado ao produto final.

Após analisadas as diferentes amostras, com diferentes concentrações de hipromelose, concluiu-se que a mais adequada, após armazenamento e quando aplicada convenientemente, será a de 1,4% de concentração de hipromelose. É a preparação que apresenta melhores características de viscosidade para aplicação tópica nas unhas e aquela que permite a secagem mais rápida, fixando mais eficazmente os compostos no substrato.

Os excipientes adicionados ao extrato permitiram obter uma preparação com características de coloração bem aceites para aplicação na unha, não sendo necessária a adição de qualquer tipo de descolorante. A nova formulação farmacêutica é agradável do ponto de vista estético, sem comprometer o potencial terapêutico. Estas características permitem aumentar a adesão à terapêutica.

Após acondicionamento e armazenamento, analisaram-se novamente as formulações obtidas e conclui-se que, para além da compatibilidade e estabilidade conseguida entre

extrato e excipientes e estes entre si, também se conseguiu compatibilidade com o material de embalagem. Após o acondicionamento o verniz manteve as suas características iniciais, durante o armazenamento e após aplicação.

Assim, pode-se considerar que os métodos descritos para a preparação das diferentes formulações, por forma a obter um verniz com propriedades antifúngicas, são válidos.

Para assegurar a qualidade das formulações desenvolvidas durante o período de armazenamento e até à data da sua aplicação, torna-se necessária a realização de ensaios de estabilidade formal.

5

**Desenvolvimento de um creme de aplicação
tópica na pele**

5.1. Introdução

Atendendo ao objetivo de obter uma formulação para aplicação cutânea, tem de se garantir que o produto, depois de aplicado, permita a fixação dos compostos ativos. Para além disso, depois de aplicada na pele, a formulação deve deixar um resíduo macroscopicamente indetetável que não seja pegajoso ou gorduroso, comprometendo a adesão à terapêutica. Assim, devem ser tidas em conta características como o aspeto, a textura, a consistência e a facilidade de aplicação, aquando da seleção da melhor formulação de aplicação cutânea.

Por forma a conseguir uma cobertura de toda e zona afetada pelo fungo e a garantir adesão do produto, será conveniente considerar-se uma preparação farmacêutica do tipo semissólida. Estas preparações têm capacidade de adesão à superfície de aplicação por um período razoável de tempo, antes de serem removidas por lavagem. Esta adesão deve-se ao seu comportamento reológico plástico, que permite aos semissólidos manter a sua forma e aderir como um filme até aplicação de uma força externa, caso em que deformam e fluem (LACHMAN, Lieberman e Kanig 2010).

Os cremes são sistemas semissólidos emulsionados, de aparência geralmente opaca. A sua consistência e carácter reológico dependem do fato de se tratar de uma emulsão do tipo água em óleo (A/O), ou óleo em água (O/A), e da natureza dos sólidos na fase interna; caracterizam-se como misturas de dois líquidos imiscíveis, na presença de tensioativos (compostos estabilizantes da forma da gotícula da fase interna), que apresentam uma estabilidade aceitável, quando deixadas num recipiente, em repouso e à temperatura ambiente. Tornam-se importantes quando dois líquidos são agitados por processo mecânico e conseqüentemente começam a aparecer gotículas, que com o repouso levam à separação dos líquidos e formação de fases. Esta separação dos líquidos pode ser diminuída ou até eliminada, por adição de emulgentes, molhantes ou tensioativos. Estes compostos são descritos como tendo duas partes distintas, uma hidrofílica e uma hidrófoba. Por esta razão, os tensioativos têm carácter anfífilos, isto é com apetência para a água e para o óleo, podendo atuar como agentes que dispersam moléculas oleosas em água ou vice-versa, dependendo das suas características.

Os tipos mais comuns de emulsões e as mais utilizadas para fins farmacêuticos e cosméticos são as emulsões em que uma das fases é a água e a outra óleo, ou outro líquido. Assim, se as gotículas do óleo estão dispersas numa fase aquosa contínua, tem-se uma

emulsão óleo em água, se pelo contrário o óleo é a fase contínua, estando a água dispersa nele, diz-se uma emulsão de água em óleo.

Atualmente as emulsões continuam a ser muito utilizadas em cosmética e farmácia. A aceitação pelo doente é, sem dúvida, a razão mais importante que justifica a utilização destes sistemas. Quando usadas para fins tópicos possuem um certo grau de elegância e são facilmente laváveis sempre que desejável. Os dois tipos de emulsões são facilmente aplicáveis para fins terapêuticos e cosméticos, sendo as emulsões do tipo O/A mais utilizadas como bases de fármacos laváveis e para os propósitos gerais dos cosméticos; as emulsões do tipo A/O são, mais largamente aplicadas no tratamento de pele seca e como emolientes. A seleção do tipo de emulsão deve ter sempre em conta a sua capacidade de penetrar na pele ou mucosas (LACHMAN, Lieberman e Kanig 2010).

É também importante referir que com estes sistemas se consegue controlar a viscosidade, aparência, teor em gordura para fins cosméticos ou dermatológicos.

Atendendo à natureza do extrato de granulado de cortiça e à finalidade que se pretende de o veicular para exercer a sua ação no tratamento de micoses da pele, é conveniente a utilização de creme tipo O/A que permita a incorporação do extrato, sem comprometer a adesão à terapêutica. Os cremes são a forma farmacêutica de eleição já que associam uma adequada espalmabilidade, permitem remoção por lavagem e são esteticamente aceitáveis. Nos cremes é crucial a concentração da mistura emulsionante.

5.2. Materiais

Para a preparação do creme usaram-se amostras de extratos derivados de granulado de cortiça, BIC19, contendo os compostos com potencial ação antifúngica. Os extratos utilizados apresentavam-se sob a forma de solução de tom acastanhado.

Os excipientes, utilizados na preparação do creme, devem garantir que o composto ativo atravesse as várias camadas cutâneas e chegue ao alvo desejado, garantindo a fixação do API e a eficácia máxima. Assim, foram selecionados excipientes que permitiram uma preparação simples da formulação, com base numa emulsão do tipo O/A.

Na preparação da fase oleosa utilizaram-se o ácido esteárico (Anexo 7) e trietanolamina (Anexo 8). O ácido esteárico fornece consistência à formulação e reage com a trietanolamina (base) formando o sabão de trietanolamina que constitui o agente emulsionante O/A.

A fase aquosa teve na sua composição, glicerina (Anexo 9) que tem efeito emoliente e humectante, evitando a evaporação rápida da fase aquosa.

A “água de rosas” foi a essência selecionada como aromatizante para melhoria das condições organolépticas (preparada internamente no laboratório).

5.3. Métodos

5.3.1. Preparação da fase oleosa

A fase oleosa é formada por derivados esteáricos.

Na preparação da fase oleosa e para completa dissolução dos excipientes, estes devem ser colocados a uma temperatura de aproximadamente 60 ou 70°C. Assim, pesaram-se 12,00g de ácido esteárico e 0,60 g de trietanolamina, numa balança analítica (série B; METTLER TOLEDO PB 153-S; SOQUIMICA), e colocaram-se numa cápsula de porcelana num banho de água à temperatura de aproximadamente 70°C. Após completa fusão e homogeneização dos excipientes, eles foram transferidos para um almofariz de porcelana, previamente aquecido.

5.3.2. Preparação da fase aquosa

A adição do extrato foi efetuada na fase aquosa.

Para isso, pesaram-se 6,75g de glicerina na balança analítica, aos quais se juntaram 30,65g de amostra de extrato, ou de uma solução do extrato, de forma a que a formulação contenha uma concentração final de 1 g da substância ativa (BICI9). A mistura foi realizada também numa cápsula de porcelana aquecida em estufa a uma temperatura de aproximadamente 60°C.

Em paralelo à preparação da fase aquosa, foi realizado um ensaio controlo, para esta fase, no qual a amostra do extrato foi substituída pela mesma quantidade de água destilada.

5.3.3. Mistura das duas fases

Após homogeneização e preparação das duas fases, juntou-se à fase oleosa, já no almofariz de porcelana, a fase aquosa, no ensaio com extrato. A mistura das duas fases foi realizada lentamente e sempre sob agitação até ao arrefecimento e perfeita homogeneização.

Também foi feita a mistura da fase oleosa com a fase aquosa controlo (água destilada), sob as mesmas condições.

5.3.4. Adição da fragrância

Para melhorar as características organolépticas foi adicionada uma essência.

A adição de essência à base de água de rosas foi feita à mistura final das duas fases, lentamente e sob agitação.

5.3.5. Estabilidade do extrato no creme

Foram também obtidos cromatogramas do extrato inicial antes de incorporado no creme, e na formulação final (Anexo 10).

5.3.6. Acondicionamento

O creme obtido foi acondicionado em frascos de polietileno com tampa de polipropileno (Figura 16).



Figura 16 - Creme para aplicação cutânea contendo BIC19 acondicionado em frascos de polietileno com tampa de polipropileno

5.4. Resultados e Discussão

Para o desenvolvimento farmacêutico do creme contendo extrato foram realizados vários ensaios, dos quais se obtiveram cinco formulações. Todas as formulações preparadas foram devidamente analisadas e comparadas com as duas formulações obtidas do ensaio controle.

5.4.1. Características organoléticas das formulações desenvolvidas

As formulações obtidas apresentaram aspeto homogêneo e aroma característico da essência adicionada, cheiro a água de rosas.

Os cremes do ensaio controle ficaram brancos (Figura 17), enquanto que os preparados com BIC19, apresentaram uma cor castanha-dourada (Figura 18), ambos com características cosméticas perfeitamente bem aceites. Esta alteração de cor deveu-se à coloração inicial do extrato, castanha.



Figura 17 - Creme obtido sem BIC19



Figura 18 - Creme contendo BIC19

5.4.2. Características da textura das várias formulações

Todas as preparações obtidas apresentaram características de consistência indicadas para a aplicação como creme na pele (Figuras 19 e 20).

A textura corresponde às características físicas percebidas pelo sentido do tato e que estão relacionadas com a deformação quando se aplica uma força. No desenvolvimento de preparações para aplicação cutânea é necessário ter em consideração certos atributos que contribuem para a aceitação do produto e melhoria da sua eficácia, como a adesividade e a espalmabilidade.



Figura 19 - Creme obtido sem BIC19



Figura 20 - Creme contendo BIC 19

Os resultados dos ensaios de viscosidade mostram valores adequados para o tipo de forma farmacêutica, nomeadamente porque se destina a espalhamento sobre a pele. Durante o período de armazenagem, foi avaliada esta característica usando placebo (formulação preparada com a mesma técnica e idêntica em termos de constituintes com exceção óbvia do extracto), verificando-se a manutenção de valores aceitáveis e que irão constituir os limites de aceitabilidade para esta especificação. A normal armazenagem (embalagem fechada) e a utilização em concordância com a posologia, não afetam as características organolépticas fundamentais.

5.4.3. Estabilidade do extrato no creme

Por comparação entre os cromatogramas obtidos (Anexo 10), pode-se verificar que os potenciais compostos ativos estão presentes nos dois cromatogramas, o que permite confirmar a estabilidade do extrato nas formulações obtidas.

5.5. Conclusões

A preparação final obtida é constituída por uma formulação simples, trifásica e que demonstra adequadas propriedades organoléticas. O creme obtido, adquiriu a consistência desejada, não sendo demasiado fluído, o que poderia comprometer a fixação dos compostos ativos na pele, nem demasiado viscoso. Quando as formulações apresentam elevada consistência, tornando-se difíceis de espalhar sobre a pele, ou pelo menos de se estenderem uniformemente em película fina, a sua aplicação pode tornar-se até dolorosa em peles lesadas, uma vez que estamos perante situações de agressão cutânea, com patologias associadas. Por vezes pode ser importante aplicar uma camada mais espessa, de modo a proteger, por oclusão, determinada área de agressão. Apresenta também uma cor agradável quando aplicado, bem como o aroma a água de rosas muito bem aceite.

Tendo sido preparados mais de três lotes para os ensaios de formulação do creme e os resultados obtidos semelhantes entre eles, pode-se concluir que houve reprodutibilidade. A reprodutibilidade obtida estende-se às características organoléticas, consistência e espalmabilidade.

Comparando as formulações obtidas contendo o extrato, com o creme sem BICI9, obtido do ensaio controlo, pode-se afirmar que os excipientes selecionados são compatíveis com o extrato, mantendo a sua estabilidade e não alterando as suas propriedades iniciais. Também os vários excipientes utilizados são compatíveis, não havendo separação de fases ou outras alterações, quando adicionados entre si. Assim, pode-se considerar que os métodos descritos para a preparação das formulações obtidas são válidos.

Para além da avaliação da compatibilidade entre compostos ativos e excipientes, e estes entre si, durante o desenvolvimento e otimização das formulações, foi também avaliada a compatibilidade dos constituintes da formulação com o material de embalagem, durante o tempo em que o creme esteve armazenado, por avaliação de potencial separação de fases. Após análise e avaliação de todos os parâmetros acima mencionados, concluiu-se que se obtiveram formulações estáveis e sem problemas de compatibilidade entre os diferentes constituintes e entre eles e o material de acondicionamento.

Foram também obtidos cromatogramas do extrato inicial, antes de incorporado no creme, e depois na formulação final (Anexo 10). Por comparação entre os cromatogramas obtidos, pode-se verificar que os potenciais compostos ativos estão presentes nos dois cromatogramas, o que permite confirmar a estabilidade das formulações obtidas.

Para assegurar a qualidade das formulações desenvolvidas durante o período de armazenamento e até à data da sua aplicação, torna-se necessária a realização de ensaios de estabilidade formal.

6

Conclusões Gerais

A OM afeta uma parte considerável da população global (LUSIANA, Reichl e Muller-Goymann 2013) e o aumento da incidência das infecções fúngicas conduziu à procura de novos antifúngicos de amplo-espectro e fungicidas, de efeitos adversos limitados ou nulos. Como consequência, novos fármacos com mecanismo de ação inovador têm sido desenvolvidos, ou são objeto de desenvolvimento. Nesta procura estão também incluídos fármacos de origem natural, à semelhança do que acontece na pesquisa dos mais variados fármacos que constituem diferentes grupos terapêuticos (SIMBAR, et al. 2008), por forma a diminuir os efeitos indesejáveis dos químicos tradicionais, ou outros. Estes compostos naturais são investigados, muitas vezes porque apresentam aplicações tradicionais comprovadas de longa data, ou por outros fatores, mas que carecem de investigação, por forma a tornarem-se possivelmente comercializados sem riscos para o doente. Fármacos de origem natural têm sido investigados por apresentarem potencial antifúngico em infecções causadas por dermatófitos (OLIVEIRA, et al. 2011).

O API utilizado neste trabalho foi resultante de um granulado de cortiça. A cortiça é uma matéria-prima natural renovável, sustentável, que tem sido utilizada por muitos séculos. Corresponde à casca do carvalho (*Quercus suber L.*), que é periodicamente retirada da árvore, geralmente a cada 9-12 anos, dependendo da região de cultura. *Quercus suber L.* é o nome botânico de um carvalho de crescimento lento que floresce apenas em regiões específicas do Mediterrâneo Ocidental, sendo Portugal dos maiores produtores de cortiça. De entre várias aplicações de alto valor agregado que esta matéria-prima apresenta, destaca-se o seu potencial farmacológico, pela sua composição em compostos de baixo peso molecular com potencialidades de interesse farmacêutico, como compostos com ação antioxidante, anti-histamínicos, anti-inflamatórios e anti-ulcerosos. Compostos para prevenção e tratamento do cancro e infecções por HIV, também são por vezes investigados. Dos compostos extraídos da cortiça fazem parte esteróides, flavonóides, elagitaninos e compostos fenólicos simples, cuja atividade biológica tem sido bem estudada. Por exemplo, os esteróides podem reduzir problemas de colesterol ou influenciar a proliferação de células cancerosas; os flavonóides apresentam importante atividade antioxidante e atividade de prevenção cancerígena (SILVA, et al. 2005). Parece assim que alguns constituintes da cortiça podem apresentar um importante papel farmacológico e na manutenção da saúde humana. O extrato usado nas formulações evidenciou, em ensaios *in vitro*, um forte potencial antifúngico contra dermatófitos, o que sugere que certos constituintes do extrato sejam

responsáveis por esta atividade, podendo constituir, os desperdícios da indústria da cortiça, uma boa matéria-prima para obtenção de compostos naturais com atividade farmacológica.

Para o tratamento de infecções fúngicas são muitas vezes usados fármacos de ação tópica. Apesar das suas limitações, o tratamento por ação tópica é uma boa opção, uma vez que para além de tratar a evolução da doença, permite recuperar e otimizar o aspeto saudável, já que das zonas mais afetadas pelos fungos se destacam zonas do corpo visíveis, como algumas partes da pele e as unhas.

Atendendo ao objetivo do trabalho, pode-se concluir que as preparações obtidas, contendo extrato derivado de granulado de cortiça, nomeadamente o verniz e creme antifúngicos, correspondem a formulações simples, reproduzíveis, estáveis e cosmeticamente aceitáveis, para cada uma das formulações (Figura 21). A estabilidade das formulações foi comprovada pela análise dos cromatogramas obtidos. Elas apresentaram cor e cheiro agradáveis, bem aceites para a sua finalidade de aplicação. Para além disso, as formulações obtidas consistem em preparações de fácil aplicação, podendo variar apenas o número de aplicações por unidade de tempo, o que faz aumentar a adesão à terapêutica. Por tudo isto se conclui que o objetivo do trabalho foi levado a cabo com sucesso e que as novas formulações farmacêuticas podem ser aplicadas em trabalhos futuros, com finalidade terapêutica antifúngica ou outras.



Figura 21 - Preparações finais obtidas contendo extrato derivado de granulado de cortiça e BIC19

Relativamente ao desenvolvimento de produtos farmacêuticos, este implica o cumprimento de determinados requisitos, bem especificados e devidamente regulamentados, de acordo com normas orientadores e guidelines.

Apesar do desenvolvimento de todos os medicamentos apresentar as suas limitações,

quando se compara o desenvolvimento de compostos tradicionalmente usados com o de produtos de origem biológica, verifica-se que os cuidados com as preparações farmacêuticas são acrescidos quando se trata da manipulação de compostos obtidos por processos biotecnológicos. Em termos farmacêuticos e de acordo com a ICH, produtos com origem em processos biotecnológicos são proteínas e polipeptídeos bem caracterizados, cujos compostos são obtidos por isolamento de tecidos, fluidos corporais, culturas celulares, ou produzidos utilizando tecnologias de DNA recombinante. Em termos práticos, são compostos usados em terapias com citosinas, eritropoetinas, fatores de coagulação sanguínea, ativador plasminogénio, hormonas e fatores de crescimento, insulinas, vacinas e anticorpos monoclonados. Avanços recentes em técnicas de biologia celular e molecular e o potencial do benefício clínico de produtos biotecnológicos, em doenças como o cancro, Alzheimer, doenças do coração, diabetes, esclerose múltipla, HIV e artrite, entre outras, têm aumentado significativamente, nomeadamente através de desenvolvimento destes produtos por parte das empresas farmacêuticas tradicionais.

A par do potencial destes produtos, novos desafios vão surgindo com base nas muitas limitações tecnológicas relacionadas com o desenvolvimento e comercialização destes complexos API. Muitos desses novos desafios passam pela avaliação e validação da natureza química e física das células e sistemas hospedeiros de expressão e consequentemente do API, à medida que vão avançando as diferentes fases de desenvolvimento e marketing. Apesar desta área ser uma verdadeira fonte de pesquisa e progresso, as limitações analíticas tecnológicas são responsáveis por muitas das dificuldades quando se lida com este tipo de compostos, nomeadamente na capacidade de resolução para caracterização destes compostos, como por exemplo, falta de resolução e detecção de estruturas secundária ou terciária, ou alterações de conformação, levando a uma diminuição do desempenho do produto ou resposta clínica comprometida. Em contrapartida, as pequenas moléculas tradicionalmente usadas pela indústria farmacêutica apresentam uma atividade biológica diretamente relacionada com a sua estrutura, que pode ser prontamente determinada por RMN, raios-X, espectrometria de massa e/ou combinação com outras técnicas espectroscópicas.

Limitando ainda mais o desenvolvimento de produtos biológicos bem sucedido é a falta de compreensão básica a respeito de processos críticos de fabricação que são susceptíveis de afetar a integridade estrutural e a atividade de biofarmacos. Tal como acontece com as pequenas moléculas usadas tradicionalmente, as diferentes operações unitárias podem afetar os produtos biofarmacêuticos. Deve considerar-se, por exemplo, que

muitas proteínas apresentam um maior potencial de degradação, que é particularmente importante para avaliar quaisquer efeitos negativos da mistura, transporte através da tubagem, filtração e operações de enchimento. Essencialmente qualquer operação unitária de um determinado processo de fabricação pode criar tensão suficiente para induzir alterações estruturais mínimas que poderiam levar à inativação do produto. A dificuldade em se estabelecer o grau de mudança tem assim um forte impacto na estabilidade, bioatividade e imunogenicidade destes compostos.

Deste modo, os pontos importantes na formulação de produtos biotecnológicos são, para além dos comuns as moléculas tradicionais, como definir a via de administração, indicações terapêuticas e limitações de alvos terapêuticos, entre outros, refinar profundamente o conhecimento adquirido do processo de fabrico do API. Esta otimização é vital para fornecer um ponto de partida inicial para o sucesso. O sistema hospedeiro utilizado para produção do API é um ponto importante no produto final e determina as básicas e mais importantes características físicas e químicas do fármaco. O problema da manipulação destes compostos prende-se, para além de outras, com questões de pureza, uma vez que as mais pequenas alterações na produção de uma linha celular podem condicionar o processo e a bioatividade do produto.

Questões também importantes no desenvolvimento de produtos de origem biológica são a via de administração selecionada, sendo usada com maior frequência a via parentérica, sob a forma de soluções, suspensões e produtos liofilizados. A escolha da via de administração deve ser feita atendendo à maior eficácia possível para o doente, com a menor toxicidade associada. É fundamental o material e o equipamento usados no desenvolvimento destes produtos. Das características primordiais destacam-se a garantia de estabilidade e esterilidade, conseguida com a utilização de recipientes que, para além de outras características, devem apresentar sistemas de fecho totalmente selados e sem forma de invasão do produto interno.

Se a escolha dos excipientes é importante aquando do desenvolvimento de formulações à base de produtos naturais tradicionais, mais importante se torna neste tipo de produtos pela natureza dos compostos em questão. Assim, a escolha dos excipientes é, sem dúvida, um ponto crítico, uma vez que, para além de permitirem condicionar e promover a libertação dos API nos alvos terapêuticos, também promovem a estabilidade do produto, o que é extremamente importante, como antes referido, quando se tratam de medicamentos derivados de processos biotecnológicos. Compostos como solubilizantes, antioxidantes, conservantes, agentes quelantes, soluções-tampão, agentes anti-espuma, inibidores de

hidrólise, antibacterianos, entres outros, tem importância inquestionável na formulação e desenvolvimento de produtos biotecnológicos. À semelhança do que acontece com as formulações tradicionais, os excipientes não devem apresentar toxicidade e devem estar em concentração e características que não interfiram com a estabilidade e bioatividade dos API, e cuja adição aos restantes constituintes da formulação proporcione compatibilidade entre eles e com os recipientes onde são acondicionados durante todo o tempo de vida do produto. Além disso, pode ser uma condição que a pureza dos excipientes a selecionar tenha de ser superior do que as indicadas nas monografias farmacopeicas, se uma impureza específica está implícita em potenciais reações de degradação. Uma das características fundamentais que os excipientes devem apresentar neste tipo de produtos, é a capacidade de hidratação de produtos biofarmacêuticos. Hidratação preferencial refere-se à hidratação das camadas sobre a superfície externa da proteína e pode ser utilizada para explicar termodinamicamente o aumento da estabilidade ou a sua desnaturação. Outros solventes devem ser coadicionados à formulação por forma a garantir a exclusão da superfície da proteína, também para aumentar a estabilidade (CARL, et al. s.d.).

Assim, e comparando o desenvolvimento farmacêutico para compostos tradicionais com as tecnologias inerentes à obtenção de produtos derivados de processos biotecnológicos, conclui-se que estes requerem muito mais experimentação e interdisciplinaridade e um esforço acrescido por parte quer da indústria farmacêutica nas suas diversas áreas, quer das entidades regulamentares que controlam e regulamentam a comercialização destes produtos.

7

Perspectivas Futuras

Como antes referido e por diversos fatores, as infeções fúngicas têm vindo a aumentar. Para contrariar esta evidência, torna-se importante a pesquisa de novos medicamentos e de novos métodos de diagnóstico. A deteção e confirmação rápida da infeção e do seu agente etiológico, são fundamentais para o sucesso do tratamento antifúngico.

Relativamente ao trabalho desenvolvido e perante os resultados obtidos, pretende-se agora avaliar e quantificar a ação farmacológica das novas formulações desenvolvidas em modelos animais e ensaiar clinicamente em voluntários humanos. Estes resultados encorajam para que mais estudos, tanto *in vitro* como *in vivo*, sejam futuramente realizados.

Será também importante avaliar os seus efeitos secundários e indesejáveis, bem como a inexistência de toxicidade. Nas concentrações eficazes, *in vitro*, e presentes nas formulações, o extrato não evidenciou toxicidade.

As formulações desenvolvidas apresentaram características que tornam possível a sua utilização noutros compostos ativos. É desafiante pensar que estas novas preparações farmacêuticas possam ter sucesso com outros API e/ou noutras indicações terapêuticas, pelo que será interessante a pesquisa e desenvolvimento de novos produtos com estas formulações de ação tópica. Trabalhos relacionados com os assuntos regulamentares que controlam estes produtos também poderá ser um importante objetivo a desenvolver, bem como os aspetos relacionados com a sua autorização de introdução no mercado.

Considerando os compostos utilizados com potencial ação antifúngica, estes podem ser reformulados noutras formas farmacêuticas, compatíveis com as características do extrato e que permitam tirar partido das suas propriedades, de modo a que os doentes possam obter resultados o mais rápido possível e a melhor qualidade de vida.

Como antes mencionado, a cortiça permite a extração e purificação de compostos para obtenção de produtos de interesse para a indústria farmacêutica. Atualmente a capacidade antioxidante apresentada por alguns compostos existentes na cortiça tem atraído a indústria farmacêutica. Outros mostram apresentar potencial ação antialérgica, anticancerígena e antimutagénica, o que pode ter interesse e ser um forte atrativo no desenvolvimento de novos produtos biotecnológicos. Para além disso, os compostos antioxidantes de origem natural podem tornar-se menos onerosos e/ou menos tóxicos do

que os compostos sintéticos o que é promissor no desenvolvimento de novas terapias.

8

Anexos

Anexo I

Eudragit® E100

Sigma-Aldrich®

- Nome IUPAC: Poli (butil metacrilato-co (-2 - demetilaminoetilo) metacrilato-co-metacrilato de metilo) 1:2:1
- Expansível e permeável acima de pH 5,0
- Peso médio da massa molar: cerca de 47.000 g/mol
- Temperatura de transição vítrea (Tg): aproximadamente 48°C
- Descrição Física: grânulos incolores tingidos de amarelo com um odor semelhante ao da amina
- Densidade aparente: cerca 640 kg/m³ aos 20 °C
- Hidrossolubilidade: praticamente insolúvel
- Solubilidade (qualitativa): solúvel em acetona, solúvel em ácidos

Anexo 2

Triacetina

Fluka®

Lote BCBD8409V

- Nome IUPAC: tri-acetato de 1,2,3 propanotriol
- Líquido límpido e incolor
- Parcialmente solúvel em água e solúvel em etanol, éter, benzeno e clorofórmio
- Solubilidade em água: 64 g/l (20 °C)
- Massa molar: 218.20 g/mol
- Densidade: 1.16 g/cm³ (20 °C)
- Valor de pH: 5.0 - 6.0 (50 g/l, H₂O, 20 °C)
- Ponto de fusão: -37 °C
- Ponto de ebulição: 258 °C (1013 hPa)

Anexo 3

Hidroxiopropilmetilcelulose (Hipromelose)

José Vaz Pereira®

Lote 0409043

- Produzida a partir da celulose, sendo um dos ingredientes presente em muitos medicamentos
- Polímero semissintético, inerte, viscoelástico
- Utilizado como um lubrificante, excipiente de entrega controlada e agente viscosificante em medicamentos
- Utilizado como emulsionante, espessante e agente de suspensão em aditivos alimentar
- Alternativa para gelatina animal

Anexo 4

Acetato de Etilo

Sigma-Aldrich®

Lote SZBC052SV

- Líquido incolor
- Aroma característico a frutas
- Muito inflamável
- Relativamente pouco volátil
- É pouco solúvel em água
- Solúvel em clorofórmio e éter
- Obtido pela esterificação direta do ácido acético com álcool etílico, em presença de um catalisador
- Utilizado como solvente de vernizes em alternativa à acetona e preparações cosméticas (perfumes, vernizes, tónicos capilares) e farmacêuticas
- Utilizado na produção de tintas de impressão para a indústria gráfica, na indústria de adesivos e colas derivados da celulose, na indústria alimentar, nos produtos de confeitaria, bebidas e doces, nas essências artificiais de frutas
- Viscosidade (20°C): 0.44mPa
- Ponto de fusão: -83°C
- Ponto de ebulição: 77°C
- Densidade (20°C): 0.90 g/cm³
- Solubilidade em água (20°C): 85.3 g/l

Anexo 5

Acetato de Butilo

Sigma-Aldrich®

Lote BCBF8303V

- Líquido incolor
- Aroma a frutas
- Solúvel em álcool, éter, cetonas e hidrocarbonetos
- Levemente solúvel em água
- Obtido pela esterificação direta do ácido acético com álcool butílico em presença de um catalisador
- Utilizado como solvente em lacas, tintas e vernizes
- Utilizado na produção de tintas de impressão para a indústria gráfica, solvente de lacas para a tingimento na indústria do couro, solvente para a elaboração de colorantes, ingredientes de sabores e essências frutais
- pH: 7,5 (Não diluído)
- Temperatura de cristalização: -73,5 °C
- Ponto de congelamento: -77 °C
- Ponto/intervalo de ebulição: 126 °C (a 1.013,25 hPa)
- Solubilidade em água: 7 g/L parcialmente miscível
- Pressão de vapor: 11,36 hPa (a 20 °C)
- Densidade: 0,8786 g/cm³ (a 20 °C)
- Massa molar: 116,16 g/mol

Anexo 6

Etanol (96%)

Aga®

Lote I2000384

- Líquido incolor
- Odor característico.
- pH: neutro
- Ponto de ebulição: 78,4 °C (a 760 mmHg)
- Ponto de fusão: – 112 °C
- Pressão de vapor: 40 mmHg (a 19 °C)
- Densidade: 0,775 a 0,795 mg/cm³(a 20 °C)
- Solubilidade: Miscível em água, éter etílico, clorofórmio, álcoois e acetona.

Anexo 7

Ácido esteárico

Scharlau®

Lote AC09261000

- Nome IUPAC: ácido octodecanóico
- Massa molar: 284.48 g/mol
- Densidade: 0.847 g/cm³ (a 70 °C)
- Ponto de fusão: 69.6 °C
- Ponto de ebulição: 383 °C

Anexo 8

Trietanolamina

Sigma-Aldrich®

Lote SZBA1170

- Nome IUPAC: 2,2',2''-Nitrilotriietanol
- Massa molar: 149.188 g/mol
- Densidade: 1.126 g/cm³
- Ponto de fusão: 20.5°C (293.65 K)
- Ponto de ebulição: 208 °C (20 hPa)
- Solubilidade: miscível em água
- Aparência: Líquido amarelo pálido

Anexo 9

Glicerina

Normax[®]

Referência I.8GL0027005P

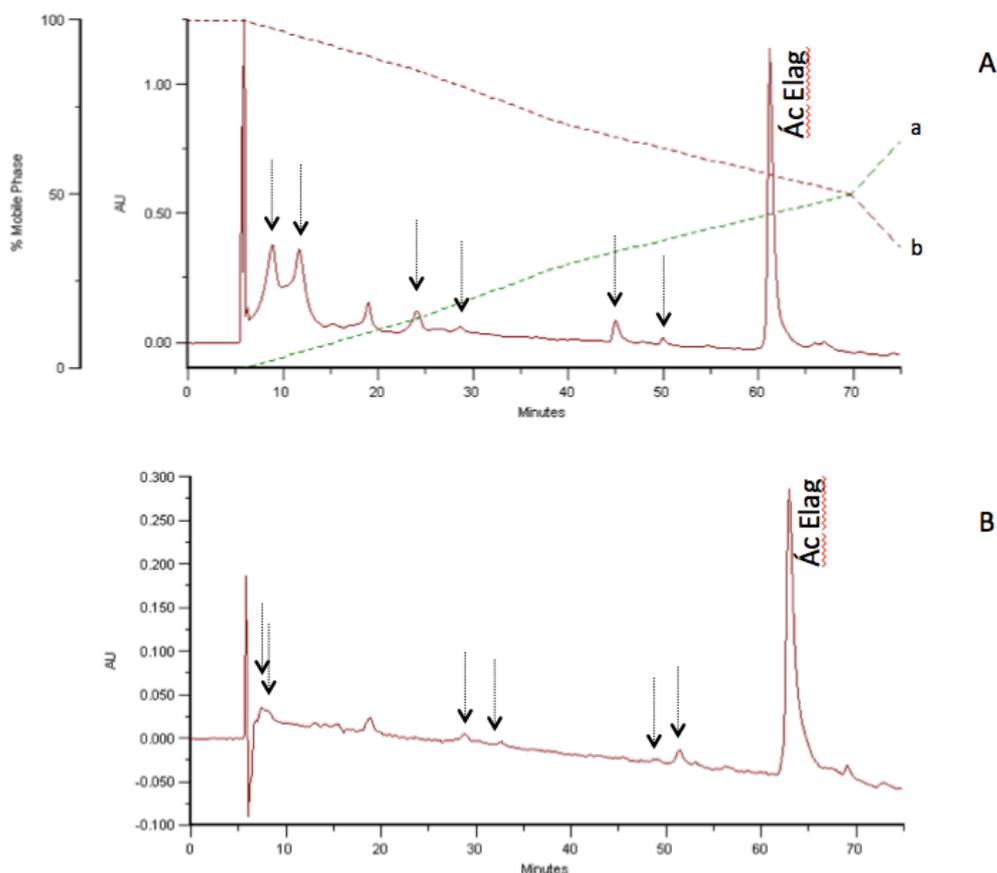
- Nome IUPAC: Propan-1,2,3-triol
- Massa molar: 92.08 g/mol
- Densidade: 1,2613 g/cm (20 °C)
- Ponto de fusão: 18.1 °C, 291 K
- Ponto de ebulição: 290 °C, 563 K
- Aparência: Líquido incolor
- Odor: Inodoro

Anexo 10**Extrato de granulado de cortiça fornecido pela “corticeira Amorim”**

Extrato de pó de cortiça fornecido pela “corticeira Amorim” extraído, a quente, com etanol-água (50:50), concentrado em evaporador rotativo e finalmente liofilizado. Este extrato demonstrou ter atividade antifúngica, nomeadamente contra dermatófitos responsáveis pela tinha, pé de atleta e fungos de unhas.

O extrato de cortiça foi solubilizado numa solução aquosa de metanol a 25%, microfiltrado e injetado.

Os constituintes do extrato foram extraídos do creme com uma mistura de água e etanol, até remoção da cor do extrato. O resíduo resultante da evaporação dos solventes foi dissolvido em metanol a 25%, microfiltrado e injetado.



A – Perfil cromatográfico, por HPLC, do extrato de cortiça que foi incorporado nas fórmulas; a e b – Perfil do gradiente usado na separação por cromatografia líquida de alta

resolução (HPLC-DAD), GILSON; a – Metanol, b – água-ácido fórmico (95:5), a um fluxo de 1 mL/min

Usou-se uma coluna C18, ODS-2 com partículas de 5 µm e com 250 mm de comprimento e 4,6 mm de diâmetro, termostaticada a 25°C.

B – Perfil cromatográfico obtido por extração dos constituintes do extrato que foi incorporado no creme. Condições cromatográficas iguais às que foram utilizadas na obtenção do perfil A.

Outros picos detetados nos cromatogramas – elagitaninos.

9

Bibliografia

ARAÚJO, Adauto, Otilio Bastos, Maria Souza, e Jeferson Oliveira. “Ocorrência de onicomicose em pacientes atendidos em consultórios dermatológicos da cidade do Rio de Janeiro, Brasil .” *An Bras Dermatol*, 2003: 299-308.

BERGOLD, A. M., e S. Georgiadis. “Novidades em Fármacos Antifúngicos: Uma Revisão.” *Visão Acadêmica*, 2004: 159-172.

BERKER, D., J. André, e R. Baran. “Nail biology and nail science.” *International Journal of Cosmetic Science* 29 (2007): 241-275.

CARL, Stephen, et al. “Biotechnology-Derived Drug Product Development.” In *Production and Processes*, 3-96. Cary: Wiley-Interscience. ISBN: 978-0-470-25958-0

CHANDRA, Ram, Sandeep Kumar, e Ashutosh Aggarwal. “Evaluation of Nail Lacquer.” *Pharmaceutical Sciences* 2(4) (2012): 379-382.

ELEZOVIC, A., S. Hadzovic, S. Hadzidedic, e S. Kostic. “Characterization of Antifungal Nail Lacquer Formulations Containing Fluconazole.” *Scientia Pharmaceutica*, September 2010: 624.

ELLIS, David. *Mycology Online*.

http://www.mycology.adelaide.edu.au/Mycoses/Superficial/Malassezia_infections/ (acedido em 18 de Agosto de 2013).

GELOTAR, Prakash, Swati Vachhani, Bhargav Patel, e Naresh Makwana. “The Prevalence of Fungi in Fingernail Onychomycosis.” *Clinical and Diagnostic Research* 7(2) (February 2013): 250-252.

INFARMED, Autoridade Nacional do Medicamento e Produtos de Saúde I.P. *Prontuário Terapêutico 11, 2013*. Montagem por INFARMED. Lisboa, 2013. ISBN: 978-989-8369-11-6

LACHMAN, Leon, Herbert Lieberman, e Joseph Kanig. *Teoria e prática na indústria farmacêutica*. 2. Vol. 2. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, 2010. ISBN:978-972-31-0908-5

LANCEROTTO, Luca, Carla Stecco, Veronica Macchi, Andrea Porzionato, Antonio Stecco, e Raffaele De Caro. "Layers of the abdominal wall: anatomical investigation of subcutaneous tissue and superficial fascia." Montagem por Springer-Verlag. *Surg Radiol Anat*, January 2011.

LANE, Majella. "Skin penetration enhancers." *International Journal of Pharmaceutics* 447 (2013): 12-21.

LUSIANA, Stephan Reichl, e Christel Müller-Goymann. "Infected nail plate model made of human hair keratin for evaluating the efficacy of different topical antifungal formulations against *Trichophyton rubrum* in vitro." *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 84 (2013): 599-605.

MAGINA, Sofia. "Antifúngicos." In *Terapêutica Medicamentosa e Suas Bases Farmacológicas*, de Serafim GUIMARÃES, Daniel Moura e Patrício Silva, 758-766. Porto: Porto Editora, 2006. ISBN:972-0-06029-8

MIYAJIMA, Yoshiharu, et al. "Rapid real-time diagnostic PCR for *Trichophyton rubrum* and *Trichophyton mentagrophytes* in patients with tinea unguium and tinea pedis using specific fluorescent probes ." *Journal of Dermatological Science* 69, n.º 3 (March 2013): 229-235.

MUI, R., C. Lee, T. Candia, J. Joyce, e E. Wimmer. "The development of "time release" nail enamels." *International Journal of Cosmetic Science* 22 (2000): 121-131.

OLIVEIRA, F. A., G. R. Teodoro, N. S. Arakawa, M. J. Salvador, e S. Khouri. "Desenvolvimento de uma formulação farmacêutica com propriedade antifúngica utilizando o óleo essencial de cravo." 2011.

PRISTA, L., Maria Bahia, e Edmundo Vilar. *Dermofarmácia e Cosmética*. Montagem por Associação Nacional das Farmácias. Vol. I. Porto, 1992. ISBN:55-142-92

RODGERS, Philip, e Mary Bassler. "Treating Onychomycosis." *American Family Physician* 63 (February 2001): 663-671.

Rodgers, Phillip, e Mary Bassler. "Treating Onychomycosis." *Practical Therapeutics*, 2001: 663-671.

SCHLOSSMAN, Mitchell. "Manicure preparations." In *Poucher's, Perfumes, Cosmetics and Soaps*, de W. A. POUCHER, 245-258. London: Charpman & Hall, 1993. ISBN: 0412273608

SILVA, S. P., M. A. Sabino, E. M. Fernandes, V. M. Correlo, L. F. Boesel, e R. L. Reis. "International Materials Reviews." *Cork:properties, capabilities and applications*, 2005: 345-365.

SIMBAR, M., Z. Azarbad, F. Mojab, e H. Majd. "A comparative study of the therapeutic effects of the *Zataria multiflora* vaginal cream and metronidazole vaginal gel on bacterial vaginosis." *Phytomedicine* 15 (2008): 1025-1031.

SMITH, K., M. Welsh, e H. Skelton. "*Trichophyton rubrum* showing deep dermal invasion directly from the epidermis in immunosuppressed patients." *British Journal of Dermatology* 145 (2001): 344-348.

TROMMER, H., e R. Neubert. "Overcoming the Stratum Corneum: The Modulation of Skin Penetration." *Skin Pharmacol Physiol* 19 (2006): 106-121.

TURNER, G., M. Hoptroff, e C. Harding. "Stratum corneum dysfunction in dandruff." *International Journal of Cosmetic Science* 34 (2012): 298-306.

VEJNOVIC, Ivana, Linda Simmler, e Gabriele Betz. "Investigation of different formulations for drug delivery through the nail plate ." *International Journal of Pharmaceutics* 386 (2010): 185-194.

WALLING, H. W. "Subclinical Onychomycosis is associated with tinea pedis." *British Journal of Dermatology* 161 (March 2009): 746-749.